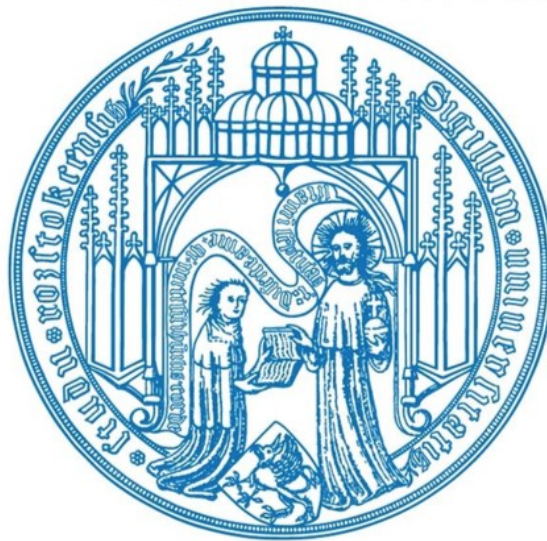


Rudolf Zenker Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock

Direktorin: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Analyse heterogener Gewebeareale des duktaalen Adenokarzinoms des Pankreas



Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von

Ann-Christin Elisabeth Albert

Geboren am 30.11.1990 in Eutin

Rostock, im Frühjahr 2017

urn:nbn:de:gbv:28-diss2018-0104-4

Dekan: Prof. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Dietmar Zechner, Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie, Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Erbersdobler, Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter: PD Dr. med. habil. Lars Ivo Partecke, Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie, Universitätsmedizin Greifswald

Datum der Verteidigung: 15.05.2018

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Glossar	I
Zusammenfassung	III
Abstract	IV
1. Einleitung.....	1
1.1. Pankreas	1
1.1.1. Anatomie, Physiologie und Histologie	1
1.2. Das duktales Adenokarzinom des Pankreas	2
1.2.1. Definition und Epidemiologie	2
1.2.2. Risikofaktoren.....	2
1.2.3. Therapie	3
1.3. Verwendete Chemotherapeutika	5
1.3.1. Gemcitabin	5
1.3.2. Metformin	6
1.4. Tumorerheterogenität	7
1.4.1. Intertumoral	7
1.4.2. Intratumoral	7
1.4.3. Einfluss der Tumorerheterogenität auf das Therapieansprechen	10
1.5. Wnt-Signaltransduktion	10
1.6. Zielstellung	12
2. Material und Methoden.....	13
2.1. In vitro Versuche.....	13
2.1.1. Zelllinien und Zellkultur	13
2.1.2. Trypanblau Assay	14
2.1.3. BrdU Assay	15
2.2. In vivo Versuche	16
2.2.1. Verwendete Mäusestämme	16
2.2.2. Syngenes orthotopes Pankreaskarzinommodell	17
2.3. Verlaufskontrollen und Gewebeentnahme.....	18
2.3.1. Evaluation des Einflusses von Gemcitabin und Metformin auf PDA.....	19
2.3.2. Evaluation des Einflusses von Diabetes mellitus und chronischer Inflammation auf PDA	19

2.3.3. Untersuchung des Wnt-Signalweges im PDA	20
2.4. Histologische, histochemische und immunhistochemische Analysen.....	20
2.4.1. Asservierung von Gewebe	20
2.4.2. Hämatoxylin/ Eosin Färbung	21
2.4.3. Histochemische Untersuchungen	22
2.4.4. ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit.....	22
2.4.5. Durchführung einer Immunhistochemie.....	23
2.5. PH-Wert Evaluation	24
2.6. Histologische Auswertung	25
2.7. Statistik.....	25
3. Ergebnisse	26
3.1. Hemmung der Zellproliferation	26
3.2. Geringer Einfluss der Therapie auf Nekrose im Tumorinneren und – randbereich	28
3.3. Geringer Einfluss der Therapien auf Apoptose.....	30
3.4. Minimaler Einfluss von Therapeutika, Inflammation und Diabetes auf die desmoplastische Reaktion.....	32
3.5. Aktivität des Wnt-Signaltransduktionsweges	34
3.6. Analyse der Genablation von Axin2.....	36
3.7. Einfluss der Glukosekonzentration auf die Wirksamkeit von Therapeutika	37
3.8. Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Wirksamkeit von Therapeutika .	40
3.9. Lokale pH-Wert Unterschiede im PDA	43
3.10. Beeinflussung der chemotherapeutischen Wirksamkeit durch den pH-Wert..	44
3.11. Einfluss des pH-Werts auf den Zelltod durch Therapeutika.....	47
4. Diskussion	49
4.1. Diskussion der Methoden	49
4.1.1. Syngenes orthotopes Karzinommodell zur Untersuchung der Tumorerogenität	49
4.2. Diskussion der Ergebnisse	51
4.2.1. Die Rolle der Wnt-Signaltransduktion in der Tumor-Stromainteraktion	51
4.2.2. Lokale Heterogenität im Karzinom.....	53
4.2.3. Mögliche Ursachen für die lokale Heterogenität des Therapieansprechens...	57
4.2.4. Schlussfolgerung	61
4.2.5. Relevanz der Ergebnisse	62

4.2.6. Ausblick	62
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	64
Literaturverzeichnis	65
Danksagung	80
Publikationsverzeichnis	81
Thesen der Dissertation.....	82
Selbstständigkeitserklärung.....	83

Glossar

Abkürzung	Bedeutung
AMP	Adenosinmonophosphat
APC-Gen	Adenomatous Polyposis-Coli Gen
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body Mass Index
BOP	N-nitrosobis (2-oxopropyl)-amine
BRCA1 und BRCA2	Breast Cancer Gene 1 und 2, engl. für Brustkrebsgen 1/2
BrdU	5-bromo-2'-desoxyuridin
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4, auch Stromal cell-derived factor 1 receptor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinacid, engl. für Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraaceta
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor, engl. für Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EZM	Extrazelluläre Matrix
FKS	Fetales Kälberserum
FOLFIRINOX	Folinsäure, 5-Fluoruracil, Irinotecan, Oxaliplatin
hCNT1 und hCNT3	Human Concentrative Nucleoside Transporter 1 and 3, engl. für Humaner Konzentrativer Nukleosid Transporter 1 und 3
H/E	Hämatoxylin-Eosin
hENT1	Human Equilibrative Nucleosid Transporter 1, engl. für Humaner Equilibrativer Nukleosid Transporter 1
HER1/HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 1/ 2, engl. für Humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 1/ 2
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor-1, engl. für Hypoxie-Induzierbarer Faktor-1
HNPCC	Hereditäres nicht-Polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom
HRP	Horseradish Peroxidase, engl. für Meerrettich Peroxidase
i.p.	Intraperitoneal
KRas	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog, engl. für Homologes Virales Kirsten Ratten Onkogen
LKB1	Liver Kinase B1, engl. für Leber Kinase B1
LoxP	Locus of X-over P1
LRP-6	Low density Lipoprotein Related Protein-6
mTOR	mammalian target of rapamycine, engl. für Ziel des Rapamycins im Säugetier
N.	Nervus

nab-Paclitaxel	nanoparticle-albumin-bound paclitaxel, engl. für Nanopartikel Albumin gebundenes Paclitaxel
NaCl	Natriumchlorid
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NOD/SCID	non-obese diabetic/ severe combined immunodeficient
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NSCLC	Non-Small Cellular Lung Cancer, engl. für Nicht-Kleinzelliges Lungenkarzinom
PanIN	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasien
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCP-Signalweg	Planar Cell Polarity, engl. für Planare Zellpolarität
PDA	Duktales Pankreasadenokarzinom
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor, engl. Für Blutplättchen Wachstumsfaktor
RNA	Ribonucleic Acid, engl. für Ribonukleinsäure
s.c.	Subkutan
SCID	Severe Combined Immunodeficiency, engl. für Schwerer Kombiniertes Immundefekt
SDF1	Stromal Cell Derived Factor-1, engl. für von Stroma-zellen abgeleiteter Faktor-1
TAF	Tumor-assoziierte Fibroblasten
TGF-β	Transforming growth factor-β, engl. für transformierender Wachstumsfaktor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TP53	Tumor Protein p53
TUNEL	TdT mediated dUTP-biotin nick end labeling
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor, engl. für Endothelwachstumsfaktor
Wnt-Signalweg	Wingless und Int-1-Signalweg
α-SMA	α-Smooth-Muscle-Actin
5-FU	5-Fluoruracil
5-JÜR	5-Jahres-Überlebensrate

Zusammenfassung

Hintergrund: Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDA) besitzt trotz jahrzehntelanger Erforschung und Verbesserungen im Bereich der Chemotherapie eine 5-Jahres Überlebensrate von nur 7 %. Als ein möglicher Grund für das Therapieversagen wird die Tumorerheterogenität solider Tumore angesehen. Auch der Einfluss des Tumorstromas auf die Progression und das Therapieansprechen des PDAs ist bekannt. Ziel dieser Studie war es, die Tumorerheterogenität des PDAs, die regionale Wirksamkeit der Therapeutika Gemcitabin und Metformin sowie verschiedene Faktoren des Tumormikroenvironments als Einflussfaktor auf die Therapeutikawirksamkeit zu untersuchen.

Methodik: Vier Behandlungsgruppen eines syngen orthotopen Pankreaskarzinommodells wurden mit PBS (Sham), Gemcitabin, Metformin oder Gemcitabin plus Metformin behandelt. Anschließend wurde der Einfluss der Chemotherapeutika auf die Zellproliferation, den Zelltod sowie auf die Apoptose in 0-210 µm (Tumorrandbereich) und 360-570 µm (Tumorinneres) Entfernung von der desmoplastischen Reaktion evaluiert. Weiterhin wurde die Aktivität der Wnt-Signaltransduktion und der pH-Wert im PDA in vivo untersucht. In vitro wurde der Einfluss von Glukose, Hypoxie und des pH- und Laktatwerts auf die Zellproliferation und den Zelltod untersucht.

Ergebnisse und Schlussfolgerung: Im PDA zeigte sich eine ausgeprägte Tumorerheterogenität, die in dieser Arbeit u.a. durch erhöhten Zelltod und Apoptose im Tumorinneren sowie einer heterogenen Therapeutikawirksamkeit nachgewiesen werden konnte. Die Tumorzellproliferation wurde durch Metformin vor allem am Tumorrand gehemmt, während Gemcitabin diese besonders im Tumorinneren reduzierte. Die Genablation von Axin2 besaß keinen Einfluss auf das Tumorgewicht. Außerdem wurde keine Aktivität der Wnt-Signaltransduktion in der desmoplastischen Reaktion nachgewiesen. Die heterogene Therapeutikawirksamkeit ließ sich nicht durch in vitro Experimente, die den Einfluss von Glukose- und Sauerstoffkonzentration bzw. des pH-Werts untersuchten, erklären. Dennoch stellen Gemcitabin und Metformin in der Therapie des PDA sinnvolle Kombinationspartner dar, da sie in unterschiedlichen Regionen des Tumors wirken.

Abstract

Background: Despite decades of research and improvements in the field of chemotherapy the ductal adenocarcinoma of the pancreas (PDA) has a 5-year survival rate of only 7 %. Tumor heterogeneity of solid tumors is considered as a possible reason for therapy failure. It is also known that tumor stroma influences the progression and the therapy response in PDA. The aim of this study was to evaluate the tumor heterogeneity in PDA, the regional efficacy of gemcitabine and metformin as well as different factors of the tumor microenvironment as influencing factors on the drug efficacy.

Methods: Four treatment groups of a syngeneic orthotopic pancreas adenocarcinoma model were treated with PBS (Sham), gemcitabine, metformin or gemcitabine plus metformin. Subsequently the influence of the chemotherapeutics on cell proliferation, cell death and apoptosis, was evaluated in 0-210 μm (tumor edge) and 360-570 μm (tumor inside) from the desmoplastic reaction. Furthermore, the activity of Wnt-signaltransduction and the pH level was analyzed in vivo. The impact of glucose, hypoxia and pH- and lactate level on cell proliferation and cell death was analyzed in vitro.

Results and Conclusion: A remarkable tumor heterogeneity was seen in an elevated cell death and apoptosis in the tumor inside as well as a heterogeneous drug efficacy in the PDA. The carcinoma cell proliferation was inhibited by metformin especially at the tumor edge while gemcitabine inhibited the proliferation particularly in the tumor inside. The gene ablation of Axin2 did not have any impact on tumor weight. Furthermore, no activity of Wnt-signaltransduction was seen in the desmoplastic reaction. The heterogeneous drug efficacy of gemcitabine and metformin could not be explained by the in vitro results. The in vivo results were not supported by the results of the examination of the impact of glucose- and oxygen-concentration or pH-level on drug efficacy. Despite this, Gemcitabine and metformin are a reasonable combination in the therapy of PDA because they take effect in different regions of the tumor.

1. Einleitung

1.1. Pankreas

1.1.1. Anatomie, Physiologie und Histologie

Das Pankreas ist ein 13 bis 18 cm langes leicht s-förmig gekrümmtes Organ. Es liegt sekundär retroperitoneal auf Höhe des zweiten Lendenwirbelkörpers in der Konkavität des Duodenums. Es besteht aus Caput, Corpus und Cauda und wird vom Ductus pancreaticus, dem Hauptausführungsgang des Pankreas durchzogen [1]. Dieser mündet oft gemeinsam mit dem Ductus choledochus an der Papilla duodeni major in die Pars descendens des Duodenums. Zu 40 % existiert noch ein zusätzlicher Ductus pancreaticus accesorius, welcher an der Papilla duodeni minor in das Duodenum mündet [2]. Von einer feinen Lage lockeren Bindegewebes, der Pankreas umgebenden Capsula fibrosa, ziehen Septen in das Organ und untergliedern es in zahlreiche 1-3 mm große Läppchen. Innerhalb dieser Läppchen liegen die Drüsenendstücke (Azini), die die zentroazinären Schaltstücke als Beginn des Ausführungsgangsystems umgeben. Diese vereinigen sich zu intralobulären- und schließlich zu interlobulären Ausführungsgängen [2]. Das Pankreas ist eine exo- und endokrine Drüse, deren exokriner Anteil, bestehend aus den Azinuszellen und dem Ausführungsgangsystem, etwa 90 % des Organs umfasst. Während die Azinuszellen die inaktiven Verdauungsenzymvorstufen produzieren, wird im Ausführungsgangsystem das Pankreassekret mit Bikarbonat angereichert. Täglich wird etwa ein Liter alkalisches Pankreassekret produziert, welches neben dem Transport der Enzyme zusätzlich der Neutralisierung des Chymus im Duodenum dient. Die wichtigsten Verdauungsenzyme sind Trypsin, Lipase und Amylase. Abgesehen von den Nukleasen, Lipasen und der Amylase werden die Verdauungsenzyme im Dünndarm durch eine Aktivierungskaskade aktiviert. Die Regulation der Sekretion erfolgt humoral vor allem über Cholezystokinin, Sekretin und Somatostatin und neural über den Nervus (N.) Vagus [3]. Der endokrine Anteil des Pankreas wird aus den Langerhans-Inseln, die in ihrer Gesamtheit als Inselzellorgan bezeichnet werden, gebildet. Die Langerhans-Inseln sind 50-500 µm große Zellansammlungen endokriner Zellen, die sich inmitten der Drüsenläppchen oder im interlobulären Bindegewebe befinden [1]. Die Inseln sind von einem dichten Kapillarnetz umgeben. Diese Kapillaren erweitern sich in den Inseln zu Sinusoiden, in welchen die produzierten Hormone ins Blut eintreten und schließlich über die Pfortader zunächst zur Leber und von dort in den

Kreislauf gelangen [2]. Die Langerhans-Inseln bestehen zu 70 % aus Insulin produzierenden B-Zellen und zu 20 % aus Glucagon produzierenden A-Zellen. 10 % der Langerhanszellen sind D-Zellen, die Somatostatin und PP-Zellen, die das pankreatische Polypeptid produzieren [4]. Die Hormonproduktion des endokrinen Pankreas ist maßgeblich an der Regulation des Kohlenhydrathaushaltes und des Blutglukosespiegels beteiligt.

1.2. Das duktales Adenokarzinom des Pankreas

1.2.1. Definition und Epidemiologie

Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDA) stellt mit 85 % die häufigste Tumorentität des Pankreas dar. Die häufigste Lokalisation ist im Pankreaskopf, nur 15 % der Tumore befinden sich im Pankreaskorpus und -schwanz [5]. Das PDA entwickelt sich häufig aus nicht-invasiven Vorläuferläsionen wie den pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) sowie in selteneren Fällen aus intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasien oder muzinös-zystischen Neoplasien [6]. Makroskopisch stellt sich der Tumor meist als weißlich-solide, infiltrativ wachsende Raumforderung mit unklar definierter Begrenzung dar. Große Tumore können eine zentrale Nekrose mit sekundär-zystischer Umwandlung aufweisen. Charakteristisch ist die intensive desmoplastische Reaktion des PDAs [7]. Die klinische Symptomatik ist meist unspezifisch und tritt häufig erst spät im Krankheitsverlauf auf. Die Symptome werden oft erst durch Metastasierung oder infiltratives Wachstum hervorgerufen, was zu einer schlechten Prognose der Tumorerkrankung führt [8]. Trotz jahrzehntelanger intensiver Forschung liegt die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) des PDAs nur bei 7 % und stellt damit die vierthäufigste krebsbezogene Todesursache der westlichen Gesellschaft dar [9]. Mit einem mittleren Erkrankungsalter von 71 Jahren ist diese Tumorentität eine Erkrankung des hohen Lebensalters [8]. 2012 betrug die Inzidenz des Pankreaskarzinoms weltweit 337,872 mit einer Letalität von 330,391 [10]. Aufgrund des demographischen Wandels wird die Inzidenz des PDAs weiterhin zunehmen und 2030 wird das Pankreaskarzinom die zweithäufigste krebsbezogene Todesursache in den USA darstellen [11].

1.2.2. Risikofaktoren

Neben dem Alter als wichtigster und unvermeidbarer Risikofaktor ist der Nikotinkonsum als wichtigster vermeidbarer Risikofaktor anerkannt. 20-25 % der Tumore können dem Rauchen zugeschrieben werden [12]. Dabei korreliert das Risiko

an einem PDA zu erkranken mit der Anzahl der täglich konsumierten Zigaretten und der Dauer des Nikotinkonsums [13–15] und bleibt für mindestens zehn Jahre nach Beendigung des Konsums erhöht [15]. Des Weiteren besteht eine positive Korrelation zwischen dem BMI und dem Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken [16]. Auch langjährigem Diabetes mellitus Typ 2 wird ein erhöhtes PDA Risiko zugeschrieben. Bei einer Krankheitsdauer von mehr als zehn Jahren ist dieses 1,5-fach erhöht [17]. Des Weiteren führt starker Alkoholkonsum zu einer signifikanten Risikoerhöhung, während ein moderater- und leichter Konsum das Risiko nicht zu beeinflussen scheint [18]. Ein erhöhtes Risiko wird auch der Blutgruppe A zugeschrieben [19]. Ein signifikant erhöhtes Risiko an einem PDA zu erkranken wird auch durch eine chronischen Pankreatitis verursacht [19, 20]. 5-10 % der Betroffenen weisen eine familiäre Disposition auf, denn durch familiäre Vorbelastung erhöht sich das Risiko an Bauchspeicheldrüsenkrebs zu erkranken um etwa das Zweifache [21]. Auch bei einigen familiären Tumorprädispositionssyndromen ist das erhöhte Risiko zur Entwicklung eines PDAs bekannt. Dazu gehört z.B. das Peutz-Jeghers-Syndrom, das hereditäre Mammakarzinom (BRCA1 und BRCA2), die hereditäre chronische Pankreatitis und das „Lynch-Syndrom“ (HNPCC) [22].

1.2.3. Therapie

1.2.3.1. Chirurgische Therapie

Die derzeit einzige kurative Therapieoption des PDAs ist die komplette chirurgische Resektion des Tumors. Durch diese kann eine 5-JÜR von 20 % erreicht werden. Allerdings ist eine chirurgische Tumorsektion auf Grund von lokal fortgeschrittenem Wachstum oder Metastasierung zum Zeitpunkt der Diagnose nur bei 10-20 % der Patienten möglich [12]. Als Operationsverfahren stehen bei Resektabilität die Duodenopankreatektomie nach Whipple oder die pyloruserhaltende Duodenopankreatektomie nach Traverso-Longmire zur Verfügung. Beide Operationsverfahren sind hinsichtlich Komplikationen, Letalität und onkologischer Langzeitergebnisse vergleichbar. Bei Nachweis von Fernmetastasen des PDAs bringt die Resektion des Primärtumors keine Verbesserung der Prognose und wird deshalb nicht empfohlen [23].

1.2.3.2. Adjuvante, neoadjuvante und palliative Therapieverfahren

1.2.3.2.1. Adjuvante Therapieverfahren

Da durch eine adjuvante Chemotherapie die 5-JÜR nach kompletter chirurgischer Resektion signifikant erhöht werden kann, wird diese bei Patienten mit gutem Allgemeinzustand empfohlen [23, 24]. Dabei wird standardmäßig Gemcitabin verwendet, welches das zuvor verwendete 5-Fluorouracil (5-FU) als Mittel der ersten Wahl abgelöst hat. Die ESPAC-3 Studie zeigte allerdings die Gleichwertigkeit von 5-FU mit Folinsäure und Gemcitabin [25]. So wurde in beiden Behandlungsgruppen durch die adjuvante Chemotherapie nach Tumorresektion ein medianes Überleben von ungefähr 23 Monaten erreicht. Jedoch zeigte das Gemcitabinregime eine bessere Verträglichkeit, da unter 5-FU-Therapie signifikant häufiger Therapie assoziierte Toxizitäten wie Mukosites und Diarrhoe auftraten [25]. Die adjuvante Chemotherapie sollte innerhalb von sechs Wochen postoperativ eingeleitet und für sechs Monate durchgeführt werden [23]. Da es keine generelle Altersbeschränkung für die Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie gibt, sollte sie nur bei Patienten mit einem schlechten Allgemeinzustand und bei Vorliegen von Kontraindikationen nicht durchgeführt werden [24, 26]. Da eine adjuvante Radiochemotherapie das postoperative Überleben weniger effektiv als eine Chemotherapie verlängert und dabei eine höhere Toxizität besitzt, gibt es zur Zeit keine generelle Empfehlung für eine adjuvante Radiotherapie [23, 27].

1.2.3.2.2. Neoadjuvante Therapieverfahren

Eine neoadjuvante Chemotherapie beim resektablen Pankreaskarzinom wird von einigen Publikationen vorgeschlagen, da so eine frühe Behandlung existierender Mikrometastasen sowie eine Reduktion der intraoperativen Tumorzellverschleppung durch eine systemische Therapie erreicht werden könne [28, 29]. Zudem konnte in einigen Studien durch neoadjuvante Chemotherapie eine größere Rate an R0-Resektionen erreicht werden [30]. Auch durch neoadjuvante Radiochemotherapie konnte in einigen kleineren Studien eine größere Rate an R0-Resektionen und damit ein verlängertes Überleben erreicht werden [31, 32]. Bei zuvor nicht resektablen Tumoren konnte durch die neoadjuvante Radiochemotherapie ein zur Primärresektion vergleichbares Überleben erzielt werden [32]. Da kontrollierte randomisierte Studien zu dieser Thematik noch ausstehen und der Nutzen neoadjuvanter Therapien noch nicht ausreichend belegt ist [33] gibt es derzeit jedoch keine Empfehlung eine

neoadjuvante (Radio-) Chemotherapie bei potentiell resektablen Pankreastumoren außerhalb von Studien durchzuführen.

1.2.3.2.3. Palliative Therapie Chemotherapie

Bei 50-60 % der Patienten liegt zum Zeitpunkt der Diagnose bereits ein metastasiertes Tumorstadium vor [9]. Unter Berücksichtigung des Allgemeinzustandes des Patienten ist in diesem Fall die Indikation zum sofortigen Beginn einer palliativen Chemotherapie gegeben. Auch Patienten mit inoperablen, lokal fortgeschrittenen Tumoren profitieren von einem palliativen Therapieregime [34]. Hierzu wird standardmäßig Gemcitabin verwendet, welches neben einer Lebenszeitverlängerung auch zu einer Verbesserung der Lebensqualität führt [35]. In den letzten Jahren sind mehrere, der Gemcitabin-Monotherapie überlegene Kombinationsregime eingeführt worden. Durch die Kombination von Gemcitabin mit dem niedermolekularen Inhibitor der Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosinkinase (EGFR) Erlotinib kann zwar eine signifikante Verlängerung des Überlebens im Vergleich zur Monotherapie erreicht werden, allerdings ist diese mit nur 13,7 Tagen klinisch kaum relevant. Tritt unter der Kombinationstherapie ein Hautausschlag als typische Nebenwirkung von Erlotinib auf, so ist die Wirksamkeit der Therapie jedoch deutlich gesteigert und das mediane Überleben verlängert sich von 5,3 Monaten im Fall eines ausbleibenden Ausschlages auf 10,5 Monate [36]. Mit dem Kombinationsregime bestehend aus 5-FU, Leucovorin, Oxaliplatin und Irinotecan (FOLFIRINOX) steht Patienten mit gutem Allgemeinzustand und günstigem Risikoprofil eine weitere, der Gemcitabin-Monotherapie überlegene Therapie zur Verfügung [37]. Unter FOLFIRINOX zeigt sich ein medianes Überleben von 24,2 Monaten verglichen mit 6-13 Monaten unter Gemcitabintherapie. Allerdings treten unter FOLFIRINOX auch häufiger schwere Nebenwirkungen auf [38]. Auch die Kombinationstherapie von nab-Paclitaxel (nanoparticle-albumin-bound paclitaxel) und Gemcitabin erzielt ein der Gemcitabin Monotherapie signifikant überlegenes Gesamtüberleben [39].

1.3. Verwendete Chemotherapeutika

1.3.1. Gemcitabin

Das Pyrimidinanalogon Gemcitabin (29,29-Difluoro-29-Deoxycytidin, dFdC) ist ein Zytostatikum, welches sich strukturell von dem intrazellulär vorkommenden Nukleosid Deoxycytidin ableitet. Von diesem unterscheidet es sich lediglich durch Fluoridierungen an Position 2' des Furanose-Ringes. Neben der Anwendung in der

Therapie des Pankreaskarzinoms wird Gemcitabin auch in der Behandlung zahlreicher anderer Neoplasien, wie dem Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC), dem Ovarial- und Mammakarzinom, dem Urothelkarzinom und hämatopoetischer Neoplasien verwendet [40]. Die zelluläre Aufnahme Gemcitabins erfolgt über Nukleosidtransporter [41]. Neben den natriumabhängigen hCNT1 und hCNT3 wird dem hENT1 eine zentrale Bedeutung in der Aufnahme von Gemcitabin zugeschrieben [42, 43]. Gemcitabin ist ein Prodrug, welches intrazellulär durch die Deoxycitidinkinase zu den aktiven Metaboliten Gemcitabin-Diphosphat (dFdCDP) und Gemcitabin-Triphosphat (dFdCTP) phosphoryliert wird. Letzteres wird aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Deoxycytidin während der DNA-Synthese inkorporiert und führt zum Abbruch der Kettenverlängerung und schließlich zur Apoptoseinduktion [44, 45]. Der Metabolit dFdCDP hemmt die Ribonukleotidreduktase irreversibel, was zu einer Erschöpfung des intrazellulären Deoxyribonukleotid-Vorrats und vermehrtem Einbau von dFdCTP in die DNA und RNA führt [46]. Weitere, durch Gemcitabinmetaboliten verursachte Effekte, sind die Hemmung der Cytidin Triphosphat Synthetase sowie der Deoxycytidylat Desaminase und die Stabilisierung des Topoisomerase-I-Cleavage-Komplex [47–49].

1.3.2. Metformin

Metformin (N,N-Dimethylimidodicarbonimid-Diamin) wurde in den 50-er Jahren für die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 zugelassen und ist das einzige Therapeutikum der Gruppe der Biguanide, das sich langfristig durchgesetzt hat [50]. Im Vergleich zu anderen oralen Antidiabetika hat Metformin ein relativ geringes hypoglykämisches Risiko. Eine seltene doch schwerwiegende Nebenwirkung ist die Laktatazidose [51]. Der Wirkungsmechanismus von Metformin ist noch nicht abschließend geklärt. Bekannt ist, dass Metformin seine blutglukosesenkende Wirkung vor allem über eine Hemmung der hepatischen Glukoneogenese vermittelt. Durch eine Metformin vermittelte Hemmung des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette kommt es zu einem Anstieg des Adenosinmonophosphat/ Adenosintriphosphat- (AMP/ATP-) Quotienten [52, 53]. Dies führt konsekutiv zu einer Aktivierung der Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AmpK) [53–55]. Außerdem führt Metformin zu einer Phosphorylierung der Leber Kinase B1 (LKB1) [56], welches eine entscheidende Rolle in der Aktivierung der AmpK darstellt [57]. Der Komplex aus LKB1 und den zwei akzessorischen Untereinheiten namens STRAD und MO25 stellt eine Kinase dar, die die AmpK an Threonin 172 phosphoryliert und ihre Aktivität steigert [58]. Die Aktivität

der AmpK moduliert Kohlenhydratstoffwechsel, Lipidstoffwechsel, Signaltransduktion, Genexpression und Zellproliferation. In epidemiologischen Studien konnte die regelmäßige Einnahme von Metformin von Diabetikern mit einer geringeren Tumorzinzidenz beispielsweise an Pankreaskarzinomen in Verbindung gebracht werden [59]. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass Metformin sowohl Apoptose induzierend als auch wachstumshemmend auf pankreatische Karzinomzellen wirkt [60, 61]. Inzwischen konnten schon einige intrazelluläre Signalwege identifiziert werden, die in Karzinomzellen durch Metformin beeinflusst werden. Dazu gehört unter anderem HER1/HER2, Src, S6K1, c-Myc, und STAT3 [62–66]. In einer experimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass Metformin die Tumorphoxie, die ein Problem in der Therapie vieler solider Tumore darstellt, vermindert und zu einer besseren Oxygenierung und Strahlensensitivität führt [67]. Diese Daten deuten darauf hin, dass Metformin einen anti-Tumor Effekt auch durch Regulierung der Tumormikroumgebung vermittelt.

1.4. Tumorheterogenität

1.4.1. Intertumoral

Intertumorale Heterogenität bezeichnet phänotypische und genotypische Unterschiede die bei Tumoren derselben Art bei unterschiedlichen Individuen beobachtet werden können. Eine pathophysiologische Heterogenität kann auch zwischen einer Metastase und seinem Primärtumor beobachtet werden [68]. Tumorerkrankungen sind niemals uniform. Es gibt eine Fülle von unterschiedlichen Klassen und Subklassen [69]. Die Individualität und Heterogenität von Tumoren unterschiedlicher Patienten ist auf viele Ursachen zurückzuführen. Abhängig vom Entstehungsort auf Stammzellebene, genetischen Prädispositionen und dem umgebenden Gewebe entwickeln sich Tumore bei den Betroffenen sehr unterschiedlich. Das Verständnis der Individualität einer Tumorerkrankung ist für die Einführung einer personalisierten Medizin essentiell.

1.4.2. Intratumoral

Nicht nur die intertumorale Heterogenität stellt eine therapeutische Herausforderung dar. Auch die strukturelle und funktionelle intratumorale Tumorheterogenität in soliden malignen Tumoren ist seit einigen Jahrzehnten bekannt und Gegenstand intensiver onkologischer Erforschung [70]. Das aktuell geltende Konzept der klonalen Evolution eines Tumors ist auf Nowell zurückzuführen und orientiert sich an der

Evolutionstheorie von Charles Darwin [71]. Durch ein initiales karzinogenes Ereignis und Akquirierung weiterer Mutationen erhält die Tumorzellsprungszelle einen Wachstumsvorteil, was zur Proliferation eines Zellklons führt. Fehler in der DNA-Replikation führen schließlich zu genetisch voneinander abweichenden Tochterzell-Subklonen, die einen unterschiedlichen Selektionsvorteil und reproduktiven Erfolg besitzen [71–73]. Die Karzinomzellen weisen verschiedene biologische Eigenschaften in Bezug auf Klonalität, Differenzierung, metabolischer Aktivität und Funktionalität auf, was letztlich Einfluss auf die Wirksamkeit von Chemotherapeutika hat [74]. Denn durch die Existenz mehrerer Subpopulationen von Karzinomzellen kann es unter einer Therapie zur Selektion von Klonen mit einer existierenden Resistenz kommen (Abb. 1).

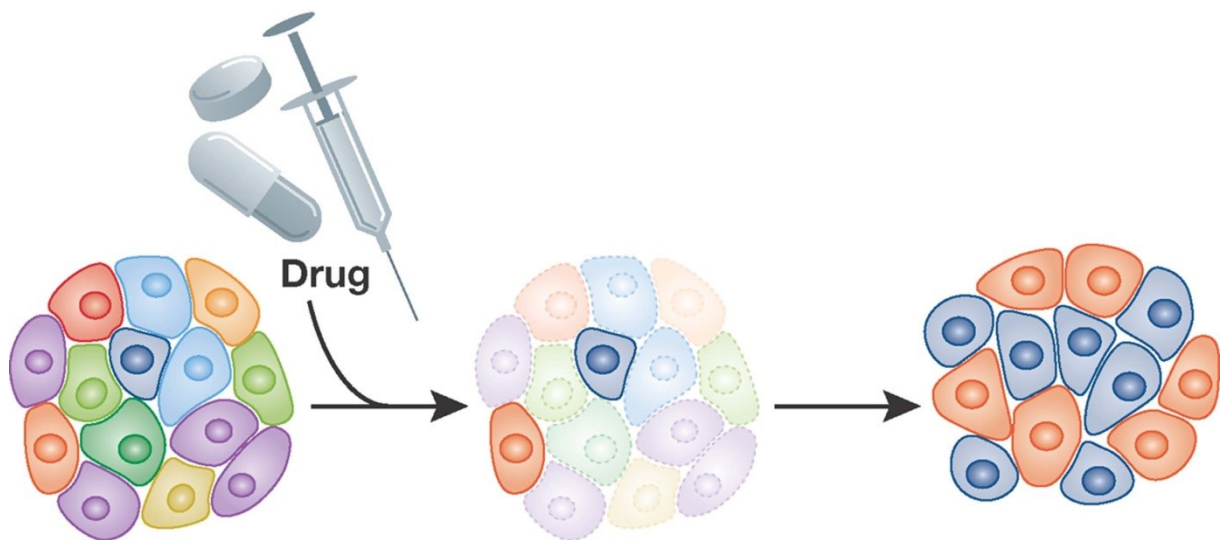


Abbildung 1: Selektive Resistenz spezieller klonaler Varianten gegenüber Chemotherapeutikum. Darstellung klonaler Varianten mit unterschiedlicher chemotherapeutischer Empfindlichkeit durch unterschiedliche Farben [74].

Auch durch die Unterschätzung des genetischen Profils eines Tumors bei Tumorbiopsien kann es zu einem Therapieversagen kommen, denn 63-69 % aller somatischen Mutationen sind nicht in allen Regionen des Tumors zu finden [75].

Eine alternative Erklärung der Tumorerheterogenität bezieht sich auf die Tumorstammzell-Theorie. Tumorstammzellen stellen eine seltene Subpopulation dar, die in Leukämien sowie in einigen soliden Tumoren wie auch dem Pankreaskarzinom nachgewiesen werden konnten [76, 77]. Eine Tumorstammzelle wird auch als Tumor-initierende Zelle bezeichnet, die das Potential hat, sich selbst zu erneuern und heterogen differenzierte Karzinomzellen zu generieren. Karzinomzellen in einem

soliden Tumor sind hierarchisch organisiert, mit den Tumorstammzellen am Apex der Hierarchie [78]. Die Tumorstammzellen sind maßgeblich an der Tumorentstehung, Progression, Metastasierung und an der Entstehung von Chemoresistenzen beteiligt [79].

1.4.2.1. Ursachen für intratumorale Heterogenität

Eine weitere wichtige Ursache für die intratumorale Heterogenität ist die Beeinflussung der Karzinomzellen durch das Tumorstroma [80]. Das Tumorstroma ist ein dynamisches Netzwerk bestehend aus Immunzellen, Fibroblasten, Myofibroblasten, infiltrierende Immunzellen, Makrophagen, Gefäßen und die extrazelluläre Matrix (EZM) [81]. Zur EZM gehören Kollagen, Elastin, Proteoglykane, Zyto- und Chemokine, Wachstumsfaktoren und Proteasen. Zellen des Tumorstromas, besonders Fibroblasten sezernieren Faktoren, die die Karzinomzellen parakrin beeinflussen [82]. Durch Interaktionen zwischen den Karzinomzellen, den Zellen des Tumorstromas und der EZM stellt das Tumorstroma eine zentrale Rolle in der Tumorentstehung-, Proliferation und Metastasierung dar [83].

In Studien konnte gezeigt werden, dass das Milieu im Tumor durch einen niedrigen pH-Wert, Sauerstoffarmut und Nährstoffmangel gekennzeichnet ist [82, 84]. Bedingt durch das Tumorwachstum und unterschiedliche Entfernungen der Zellen zur arteriellen Versorgung, gibt es im Tumor Sauerstoff-, Nährstoff- und pH-Gradienten [85]. Durch eine große Proliferationsrate der Karzinomzellen, die zu einer zunehmenden Entfernung der Karzinomzellen von den Sauerstoff führenden Gefäßen führt, existieren innerhalb eines Tumors hypoxische Regionen. Außerdem ist das Gefäßsystem des Tumors für die Sauerstoffversorgung häufig insuffizient. Diese Tumorphypoxie ist oft mit einer zentralen Tumornekrose verbunden. Karzinomzellen besitzen die Voraussetzung, diese Umstände optimal zu nutzen, so kann z.B. von einem aeroben Stoffwechsel zu einem anaeroben Stoffwechsel bei Bedarf umgestellt werden [86]. Durch Hypoxie wird der Hypoxie-induzierbare Faktor-1 (HIF-1) aktiviert. Mehr als 60 Gene wie z.B. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Erythropoetin, und Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) werden durch diesen Transkriptionsfaktor gezielt bei Hypoxie exprimiert. Diese begünstigen neben einem suffizienten Metabolismus auch die Tumorprogression [87, 88]. Die vorherrschenden Bedingungen des Tumorstromas begünstigen Mutationen und Veränderungen der Genexpression [89].

1.4.3. Einfluss der Tumorheterogenität auf das Therapieansprechen

Charakteristisch für das Pankreaskarzinom ist das Vorhandensein einer beträchtlichen Menge an Tumorstroma, das bis zu 90 % der Tumormasse ausmachen kann [90, 91]. Dieses wird zu einem großen Anteil von aktivierten Pankreatischen Sternzellen gebildet, die über multiple Faktoren, wie dem platelet-derived growth factor (PDGF), dem Transformierender Wachstumsfaktor β (TGF β) und dem Sonic Hedgehog-Signalweg durch die den Karzinomzellen aktiviert werden [91–93]. Während die desmoplastische Reaktion früher als Verteidigungsmechanismus des Hosts gegen eine Tumordinvasion angesehen wurde, wird ihre Funktion heute in der Begünstigung des Tumorwachstums und der Tumordinvasion, dem Schutz vor Apoptose und als Barriere gegen Chemotherapeutika gesehen [94–96]. Die „Unempfindlichkeit“ des PDAs gegenüber Gemcitabin kann auf die Undurchlässigkeit der desmoplastischen Reaktion auf Grund mangelhafter Vaskularisation zurückgeführt werden, die die Anreicherung des Chemotherapeutikums im Tumor beschränkt. Durch die Ablation des Tumorstromas mit Hilfe des Hedgehog Antagonisten IPI-926 oder der Verringerung der Hyaluronsäuremenge im PDA durch PEGPH20 konnte ein verbesserter Gemcitabintransport zu den Karzinomzellen und damit ein erhöhter Tumorzelltod gezeigt werden [96–98]. Die Gemcitabinresistenz des PDAs kann somit, zumindest teilweise, der anatomischen Heterogenität zugeschrieben werden. In einigen Studien konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die therapeutische Verringerung des Tumorstromas zu einer erhöhten Tumoraggressivität und Invasivität führen kann, weshalb ein genaues Verständnis der Tumor-Stroma Interaktion für die Einführung neuer Therapien Voraussetzung ist [99].

Aufgrund insuffizienter Vaskularisation und unterschiedlicher Distanzen zu den versorgenden Gefäßen existiert in vielen soliden Tumoren ein Gradient der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung, sowie ein inhomogener pH-Wert [85, 100]. Diese charakteristischen Eigenschaften beeinflussen beispielsweise durch eine Veränderung des Genexpressionsmusters oder durch Selektionsdruck die Therapeutikawirksamkeit [101–105].

1.5. Wnt-Signaltransduktion

Das Verständnis molekularer Mechanismen und Signalwege, die die Zellentwicklung kontrollieren, ist Grundlage, um fehlgeleitete Zellentwicklung erkennen und vorbeugen zu können. Zu den Signalwegen, die bislang ausführlich untersucht worden sind,

gehört die Wnt-Signaltransduktion. Diese spielt in der Embryogenese über die Aktivierung verschiedener Zielgene eine zentrale Rolle und ist an der Zelldifferenzierung und -migration, der Organogenese, sowie der Strukturierung des Nervensystems beteiligt [106]. Neben der Aktivität in zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen ist die Fehlfunktion der Wnt-Signaltransduktion in der Karzinogenese bei verschiedenen Tumoren wie Kolorektalen- und Lebertumoren beschrieben worden [107, 108].

Der Wnt-Signaltransduktionsweg wird eingeteilt in einen β -Catenin-abhängigen, kanonischen Teil und einen β -Catenin-unabhängigen, nicht-kanonischen Teil [106]. In dieser Arbeit wird der kanonische Wnt-Signaltransduktionsweg betrachtet und im Folgenden der Bezeichnung „Wnt-Signaltransduktion“ gleichgesetzt. Das ubiquitär von der Zelle ins Zytoplasma sezernierte Protein β -Catenin wird bei Abwesenheit eines Wnt-Liganden vom ebenfalls im Zytoplasma existenten Axin-Komplex erkannt und phosphoryliert, was zur Degradation führt. Durch die Bindung des Wnt-Signalproteins, das von verschiedenen Zellen sezerniert werden kann, an Rezeptoren der Frizzled-Familie und deren Co-Rezeptor LRP-6 (Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein) erfolgt die Aktivierung der Wnt-Signaltransduktion [109, 110]. Denn durch die Bindung des Wnt-Signalproteins erfolgt eine komplexe Reaktion, die durch das Protein Dishevelled vermittelt zu einer Bindung und Inhibierung des Axin-Komplexes an den Rezeptorkomplex und damit verbundenen Inhibierung der Phosphorylierung von β -Catenin führt [111]. Daraufhin folgt die Akkumulierung von β -Catenin im Zytoplasma und eine Translokation in den Nukleolus, was zu einer konsekutiven Aktivierung der Transkription von Zielgenen führt. Zu diesen gehört beispielsweise das Protoonkogen c-Myc, welches Einfluss auf die Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose hat [112, 113].

Die Bedeutung der Wnt-Signaltransduktion im PDA ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Eine erhöhte β -Catenin-Aktivität im PDA oder PanIN konnte in mehreren Studien festgestellt werden [114]. Während in kolorektalen Tumoren die Aktivierung der Wnt-Signaltransduktion auf Mutationen des CTNNB1-Gens (β -Catenin) oder des APC-Gens (Adenomatous Polyposis-Coli) zurückgeführt werden kann [115], erfolgt die Aktivierung im PDA vermutlich auf einem alternativen Weg [116]. Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Aktivität der Wnt-Signaltransduktion und dem Metastasierungsverhalten des Pankreaskarzinoms [117]. Eine wechselseitige

Interaktion zwischen den Pankreaskarzinomzellen und dem Tumorstroma über Wnt-Signaltransduktion wird diskutiert [118–120].

1.6. Zielstellung

Trotz jahrzehntelanger Forschung hat sich die Prognose des Pankreaskarzinoms kaum verbessert. Ein Verständnis der Beeinflussung der Karzinomzellen durch das Tumorstroma ist essentiell, um bessere Therapieansätze zu entwickeln. Auch die Rolle des Tumorstromas im Therapieversagen derzeit verwendeter Therapeutika gilt es zu untersuchen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Effekte von Metformin und Gemcitabin auf die Pathophysiologie von Karzinomzellen in unterschiedlichen Regionen des duktales Pankreasadenokarzinoms in einem syngen orthotopen Pankreastumormodell zu charakterisieren. Basierend auf diesen Beobachtungen wurden Parameter der Tumormikroumgebung, wie die Glukose- und Sauerstoffversorgung und der pH-Wert, auf die Pharmakoresistenz der Karzinomzellen in vitro analysiert. Zusätzlich wurden weitere Parameter, die eine Relevanz in der Tumor-Stroma Interaktion des Pankreaskarzinoms haben könnten, wie die Aktivität der Wnt-Signaltransduktion, untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. In vitro Versuche

2.1.1. Zelllinien und Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien 6606PDA, 6606I und 7265PDA wurden uns von Prof. Tuveson von der Universität Cambridge, UK, zur Verfügung gestellt. Die Zelllinien 6606PDA und 6606I wurden ursprünglich aus einem pankreatischen Adenokarzinom bzw. der entsprechenden Lebermetastase (6606I) einer genetisch veränderten C57BL/6J Maus isoliert. Diese Mäuse besaßen ein konditionales Cre/loxP Rekombinationssystem und exprimierten p48-Cre vermittelt, onkogenes KRasG12D im Pankreas [121]. Durch den p-48 Promotor wird die Cre-Rekombinase exprimiert. Diese entfernt eine mit LoxP markierte Stopsequenz vor dem KrasG12D Gen, was die Kras Expression im Pankreas ermöglicht. Die 7265PDA Zelllinie wurde aus einer Maus isoliert, die zusätzlich zu onkogenem KRas^{G12D} noch mittels Pdx-1-CreERTM p53^{R172H} im Pankreas exprimiert.

Die Karzinomzelllinien wurden in jeweils 10 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland, FG 0435) mit 4,5 g/l Glukose (Hypoglykämie-Versuch hiervon abweichend), 10 % fetalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Biochrom GmbH, A2212) in einer Zellkulturschale bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem C150-Inkubator (BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland) kultiviert.

Um in den in vitro Experimenten die Einflussfaktoren des Mikroenvironments auf die Gemcitabin- und Metformin vermittelten Effekte auf die Karzinomzellen zu untersuchen, variierten wir bestimmte Kulturbedingungen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Abweichende Kulturbedingungen in den einzelnen Versuchen

Einfluss der Glukose-konzentration	Einfluss der Sauerstoff-konzentration	Einfluss von pH-Wert und Laktat
„Hypoglykämie“: Kulturmedium: 0,5 g/l Glukose	„Hypoxie“: Inkubation in Innova CO-48 Inkubator (New Brunswick Scientific Co, Edison Edison, USA) mit 1 % Sauerstoffzufuhr	pH 7,8: 100 ml Medium versetzt mit 2 ml HEPES, danach Titration mit NaOH pH 6,8: 100 ml Medium versetzt mit 2 ml HEPES, danach Titration mit HCL, 10 mM Laktat (71718, Sigma-Aldrich)

2.1.2. Trypanblau Assay

Der saure Azofarbstoff Trypanblau dient der Vitalitätsfärbung von Zellen. Das Anion des Trypanblaus bindet an Zellproteine und führt zur dunkelblauen Anfärbung. Da nur die Zellmembran von toten oder beschädigten Zellen passiert werden kann, erscheinen vitale Zellen lichtmikroskopisch hell und avitale Zellen dunkelblau.

Die 24 Kavitäten umfassenden Mikrotiterplatten wurden mit 3×10^4 oder $1,5 \times 10^4$ pro Well befüllt und mit DMEM-Biochrom, 4,5 g Glukose/l und 10 % FCS für 24 Stunden inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung des Ansatzes, dessen Zellen eine gleichmäßige Konfluenz von 10-20 % erreicht hatte, mit PBS (Sham), Gemcitabin, Gemcitabin plus Metformin oder Metformin.

Zunächst wurden die Metformin- und Gemcitabinmedien vorbereitet, die für die Behandlung der Zellkulturen verwendet wurden. Für die Herstellung der Gemcitabinlösung wurden 10 mg Gemcitabin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München, Deutschland, G6423) mit 667,4 µl PBS vermischt, um eine 50 mM Gemcitabinlösung zu erhalten. Für die Trypanblau-Assays wurde 0,1 µM Gemcitabin- und 20 mM Metforminmedium verwendet. Bei Behandlung mit Metformin- und Metformin in Kombination mit Gemcitabinmedium erfolgte eine einstündige Vorbehandlung mit 20 mM Metformin.

Nach abgeschlossener Inkubationszeit (Tabelle 2) erfolgte die Auswertung. Dafür wurde für jede Kavität das Medium mit den darin gelösten Zellen in ein Mikoreagenzglas überführt. Nach einem Waschschrift, wurden die in den Kavitäten verbliebenen Zellen mittels 200 µl EDTA-Trypsin bei 37 °C abgelöst. Anschließend wurden die abgelösten Zellen mit den, in den Mikoreagenzgläsern befindlichen Zellen vereint. Im Anschluss wurde 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl 0,4 % Trypanblaulösung (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) vermischt. Da Trypanblau nach zu langer Inkubationszeit zytotoxisch wirkt, erfolgte sofort die Auszählung der Trypanblau positiven Zellen mittels Neubauerzählkammer und Auflichtmikroskop (Leica Mikrosysteme). Es wurde der Prozentsatz der Trypanblau positiven Zellen zur Gesamtzellzahl ermittelt.

Tabelle 2: Trypan Blau: Inkubationszeit Therapeutika in den einzelnen Versuchen

Versuch	Inkubationszeit mit Therapeutika
Einfluss der Glukosekonzentration	24 Stunden
Einfluss von Hypoxie	72 Stunden
Einfluss von pH-Wert und Laktat	48 Stunden

2.1.3. BrdU Assay

5-Bromo-2 Desoxyuridin ist ein Analogon des Thymidin und konkurriert während der Zellproliferation mit diesem um die Inkorporation in die neu synthetisierte DNA.

In einer 96 Kavitäten umfassenden Mikrotiterplatte wurden 4×10^3 Zellen pro Kavität ausplattiert und wie oben beschrieben für 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Behandlungsmedien Normal- (Sham), 0,1 μM Gemcitabin-, 0,1 μM Gemcitabin- und 20 mM Metformin- oder 20 mM Metforminmedium hinzugefügt. Die entsprechenden Zellen wurden vorher jeweils für eine Stunde mit 20 mM Metformin vorbehandelt. 24 Stunden vor Ende der Inkubationszeit (Tabelle 3) wurden pro Kavität 10 μl BrdU-labeling-reagent (Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit I, Roche Diagnostics GmbH) hinzugegeben. Nach Ablauf dieser 24 Stunden wurden die BrdU-Lösung und das Kulturmedium entfernt und durch 200 μl Fixierungslösung ersetzt. Dieses dient der Denaturierung der DNA, wodurch das inkorporierte BrdU für die Bindung eines mit Peroxidase gekoppelten Antikörpers zugänglich wird. Das anschließend hinzugefügte Tetramethylbenzidin wird durch die Peroxidase chromogen oxidiert. Durch die photometrische Messung dieses Stoffumsatzes bei 450 nm wird die Menge des inkorporierten BrdUs quantifiziert. Die gemessene Absorption ist proportional zur Menge der BrdU inkorporierten, neu synthetisierten DNA und somit ein direkter Indikator der Zellproliferation. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie oben beschrieben. Die Inkubationszeit variierte in den einzelnen Versuchen (Tabelle 3).

Tabelle 3: BrdU: Inkubationszeit Therapeutika in den einzelnen Versuchen

Versuch	Inkubationszeit mit Therapeutika
Einfluss der Glukosekonzentration	24 Stunden
Einfluss von Hypoxie	72 Stunden
Einfluss von pH-Wert und Laktat	48 Stunden

2.2. In vivo Versuche

2.2.1. Verwendete Mausstämme

Für die Evaluation des Einflusses von Gemcitabin und Metformin auf PDA wurden männliche C57BL/6J Mäuse aus der Zentralen Versuchstierhaltung der Universität Rostock verwendet. Dieser Mausstamm wurde ursprünglich vom „The Jackson Laboratory“ (Bar Harbor, Maine, USA) erworben und in der eigenen Versuchstierhaltung weiter vermehrt.

Zur Evaluation des Einflusses von Diabetes mellitus und chronischer Inflammation auf PDA wurden männliche B6.V-Lepob/ob Mäuse (obese Mäuse) mit einer homozygoten Nonsense-Mutation des obese Gens verwendet. Dieses diente der Simulation eines Diabetes mellitus Typ 2 ähnlichen Zustandes. Durch diese Mutation wird das Sättigungshormon Leptin nicht exprimiert. Die Mäuse besitzen kein ausreichendes Sättigungsgefühl, was zu Adipositas mit Hyperglykämie, Glukoseintoleranz und Hyperinsulinämie führt. Als Kontrollgruppe dieser Tiere wurden männliche B6.V-Lep+/? (lean Mäuse) mit heterozygoter Leptinmutation oder einem homozygot nicht mutierten Leptingen verwendet.

Als Versuchstiere zur Untersuchung des Wnt-Signalweges im PDA dienten Tiere des Axin2^{tm1Wbm} Mausstammes. Dieser Stamm war ein Geschenk von Prof. Walter Birchmeier (Berlin, Germany). Durch Einfügen des β -Galaktosidase Gens in den Axin2-Genlocus entstanden Axin2^{+/*lacZ*}-Reportermäuse, die β -Galaktosidase bei Aktivität des Wnt-Signalweges exprimieren. Axin2 unterstützt die Phosphorylierung und Degradierung von β -Catenin, was zu einer Rückkopplungshemmung des Wnt-Signalweges führt. Bei Axin2^{*lacZ*/*lacZ*} Mäusen wurden beide Axin2-Allele durch das β -Galaktosidase Gen ersetzt. Diese genetische Variante wurde durch Züchtung in der eigenen Versuchstierhaltung erreicht. Als Kontrollgruppe dienten genetisch unveränderte (Axin2^{+/+}) Tiere.

In allen Versuchen stand den Mäusen Wasser und übliches Laborfutter zur freien Verfügung, die Tierhaltung erfolgte unter Standard-Laborbedingungen. Alle Versuche wurden in Übereinstimmung mit der deutschen Gesetzgebung und der EU-Direktive 2010/63/EU durchgeführt.

2.2.2. Syngenes orthotopes Pankreaskarzinommodell

Für die orthotope Tumorzellinjektion erfolgte zunächst eine Zentrifugation von 280 µl gekühlter Zellsuspension ($2,5 \times 10^5$ Zellen/10 µl) Pankreaskarzinomzellen für fünf Minuten bei 1000 rpm (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland, CS6RF). Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 2 ml Medium resuspendiert. Es wurde die äquivalente Menge an Matrigel (BD Bioscience, San José, Kalifornien, USA, NR. 354248) zugefügt und $2,5 \times 10^5$ Zellen in 20 µl (PBS Matrigel 1:1) pro Injektion verwendet. Bis zur Injektion wurde die Zellsuspension auf Eis gelagert. Zur Narkoseeinleitung wurde eine Isofluran-Inhalationsnarkose mit 2,5 % Isofluran (Actavis Deutschland GmbH & Co. KG, München, Deutschland) 0,8 l/min O₂ und 1,6 l/min N₂O (Inhalationsgerät Sulla 808, Dräger Medical, Lübeck, Deutschland) verwendet. Anschließend wurde die Narkose mit 1,2 % Isofluran fortgeführt. Um ein Austrocknen der Augen vorzubeugen, wurde den Versuchstieren fünfprozentige Dexapanthenolsalbe (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) aufgetragen. Zur Gewährleistung einer postoperativen Analgesie wurde 5 mg/kg Carprofen (Rimadyl, Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland) subkutan injiziert. Nachdem die Tiere in Rückenlage auf einer Wärmeplatte gelagert wurden, wurde das Abdomen rasiert und mit Povidon-Iod desinfiziert. Mit einer etwa 1 cm langen Querlaparatomie wurde das Abdomen eröffnet. Das Duodenum wurde aufgesucht, vorsichtig mobilisiert und der Pankreaskopf dargestellt. Mit einer vorgekühlten ga22s 710 RN 100ul Spritze (Hamilton Spritze, Reno, Nevada, USA) wurden 20 µl der vorbereiteten Pankreaskarzinomzellen injiziert. Nach der Injektion von $2,5 \times 10^5$ Zellen wurde bei erfolgreicher Injektion eine Quaddel beobachtet. Nach ca. 20 Sekunden hatte sich das Matrigel weitgehend verfestigt und die Hamilton Spritze konnte aus dem Stichkanal zurückgezogen werden. So konnte ein auf das Pankreas begrenztes Wachstum der Karzinomzellen sichergestellt werden. Das Matrigel hat im gekühlten Zustand eine flüssige Konsistenz, welche bei Wärme gelartig wird. Während des Zurückziehens der Injektionsnadel wurde der Stichkanal mit einem Wattestäbchen abgedeckt, um einer Dissemination der Karzinomzellen in das Intraperitoneum vorzubeugen. Anschließend wurden die Organe repositioniert und das Abdomen in zwei Schichten verschlossen. Die Muskelschicht wurde mit einer fortlaufenden, beschichteten 5-0 Vicryl Naht (Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt, Deutschland) vernäht. Die Hautschicht wurde mit 5-0 Prolene Einzelknopfnähten (Johnson & Johnson MEDICAL GmbH) vernäht. Die Tiere wurden postoperativ in Seitenlage vor einer Rotlichtlampe

gelagert. Bis zum Ende des Versuches wurden die Tiere täglich mit 800 mg/l Metamizol (Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) im Trinkwasser analgetisch versorgt.

2.3. Verlaufskontrollen und Gewebeentnahme

Zu Beginn des Versuches am Tag 0 erhielten die Versuchstiere individuelle Ohrmarkierungen. Außerdem erfolgte eine retrobulbäre Blutabnahme mit Hilfe einer Glaskapillare unter Isofluran/N20-Narkose, eine Blutglukose-Bestimmung sowie eine Messung des Körpergewichts. Die Blutglukosekonzentration wurde mit Hilfe eines Blutzuckermessgeräts (Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) bestimmt. Dafür wurde der distale Schwanz der Maus mit einer Kanüle punktiert, um einen Blutstropfen zu erhalten.

An Tag 7 erfolgte die orthotope Tumorzellinjektion, sowie eine weitere Gewichts- und Blutzuckerkontrolle. An den ersten drei postoperativen Tagen erfolgte eine intensive Überwachung der Mäuse. Während aller Versuche wurden die Basisparameter Körpergewicht und Blutzucker regelmäßig kontrolliert, um den Gesundheitszustand der Versuchstiere zu überprüfen. 2,5 Stunden vor der Euthanasie des Versuchstieres erfolgte in allen Versuchen eine i.p. Applikation von 2,5 µl/g Körpergewicht BrdU-Lösung (20 mg/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, B5002). Da BrdU in proliferierenden Zellen in die DNA inkorporiert wird, kann hiermit die Tumorzellproliferation post mortem festgestellt werden.

Die Narkosetiefe wurde mittels Schmerzreizes überprüft. Es erfolgte eine retrobulbäre Blutentnahme mit Hilfe einer Glaskapillare. Durch eine zervikale Dislokation wurde das Versuchstier euthanasiert. Das Abdomen wurde mit einer Längslaparotomie eröffnet, der Darm mobilisiert und das Mesenterium nach eventuellen Metastasen abgesucht. Anschließend wurde der Pankreas mitsamt Tumor dargestellt. Es erfolgte eine Resektion des Pankreas und Pankreastumors, der Leber und des Darmes. Die Leber wurde makroskopisch auf Metastasen untersucht, der Pankreastumor freipräpariert und anschließend mittig zerteilt. Die eine Hälfte des Pankreastumors, rechter Leberlappen und Darm wurden in 4 % phosphatgepufferter Formalin Lösung (Grimm med. Logistik GmbH, Torgelow, Deutschland) fixiert. Die andere Tumorthälfte, ein weiterer Leberlappen sowie ein Teil des Darmes wurden in Tissue-Tek-Einbettmedium (Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Niederlande) gegeben und bei -20 °C eingefroren.

2.3.1. Evaluation des Einflusses von Gemcitabin und Metformin auf PDA

Die entsprechenden Behandlungen erhielten die Versuchstiere ab den 15. Versuchstag. Die Metforminbehandlungsgruppe erhielt von Tag 15 bis Tag 22 250 mg/kg Körpergewicht und von Tag 23 bis 36 in reduzierter Dosierung 125 mg/kg Körpergewicht Metformin i.p. appliziert. Die Mäuse der Gemcitabinbehandlungsgruppe erhielten an den Tagen 16, 19, 23, 26, 31 und 34 Gemcitabin-Injektionen i.p. in einer Dosierung von 50 mg/kg Körpergewicht. Tiere der Gemcitabin und Metformin Kombinationsgruppe erhielten sowohl die Metformin- als auch die Gemcitabintherapie entsprechend den oben beschriebenen Protokollen. Der Abstand zwischen der Metformin- und Gemcitabinapplikation betrug dabei 1,5 Stunden. Die Tiere der Sham Behandlungsgruppe erhielten eine PBS-Injektion, die der Häufigkeit der Metformin- und Gemcitabinapplikation entsprach. Die Gewebe- und Blutentnahme sowie die Euthanasie des Versuchstieres erfolgte am 36. Tag unter 90 mg/kg Ketamin (100 mg/ml bela-pharm GmbH &Co., Vechta, Deutschland) und 7 mg/kg Xylazin (20 mg/ml Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland) Narkose. Die Tumorzellinjektion, die Therapie der Tiere, die Pankreaskarzinom- und weitere Probeentnahmen sowie die Gewebeasservierung ist von Florian Bürtin durchgeführt worden [122].

2.3.2. Evaluation des Einflusses von Diabetes mellitus und chronischer Inflammation auf PDA

Die Versuchstiere wurden vier unterschiedlichen Behandlungsgruppen zugeteilt. Bei jeweils einer Versuchsgruppe der lean und obese Mäuse wurde ab dem 8. postoperativen Tag durch repetitive intraperitoneale Cerulein (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland, C9026) Injektion, eine chronische Pankreatitis erzeugt. Dabei wurde Cerulein in einer Dosis von 50 µg/kg Körpergewicht dreimal täglich mit einem Abstand von jeweils einer Stunde i.p. appliziert. Diese Behandlung erfolgte an drei Tagen pro Woche über einen Zeitraum von zwei Wochen. Den Kontrollgruppen, bestehend aus jeweils einer Gruppe von obese und lean Tieren, wurden nach demselben Schema äquivalente Mengen einer 0,9 % Natriumchlorid-(NaCl) Lösung i.p. appliziert. Die Gewebe- und Blutentnahme erfolgte am 27. Tag unter Ketamin-Xylazin Narkose. Die Tumorzellinjektion, die Therapie der Tiere, die Pankreaskarzinom- und weitere Probeentnahmen sowie die Gewebeasservierung ist von Tobias Radecke durchgeführt worden [123].

2.3.3. Untersuchung des Wnt-Signalweges im PDA

Für die Untersuchung des Wnt-Signalweges wurden $Axin2^{lacZ/lacZ-}$, $Axin2^{+/lacZ-}$, $Axin2^{+/+}$ -Tiere, die eine intrapankreatische Tumorzellinjektion erhalten hatten, in zwei Gruppen eingeteilt. Bei der „frühen Gruppe“ erfolgte die Tumorasservierung bereits nach 14 Tagen, bei der „späten Gruppe“ an Tag 27 bzw. 28 (siehe Abb. 2).

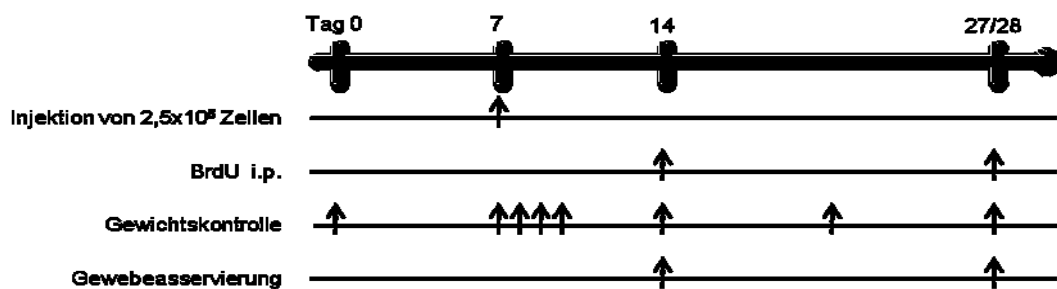


Abbildung 2: Behandlungsplan „Untersuchung der Wnt-Signaltransduktion im PDA“. An Tag 7 erfolgte die orthotope Tumorzellinjektion und Gewichtskontrolle, die regelmäßig wiederholt wurde. Zur Überprüfung des Gesundheitszustandes erfolgte dieses in den ersten drei postoperativen Tagen täglich. Die Tumorasservierung wurde am 14., 27., oder 28. Tag durchgeführt. 2,5 Stunden vor Tumorasservierung erfolgte eine i.p. BrdU-Injektion.

2.4. Histologische, histochemische und immunhistochemische Analysen

2.4.1. Asservierung von Gewebe

Um eine dauerhafte Haltbarkeit zu garantieren und eine Autolyse zu verhindern, wurde das Gewebe für 24 h in 4 % Formalin (Grimm med. Logistik GmbH, Torgelow, Deutschland) fixiert. Da die Gewebe in hydrophoben Paraffin eingebettet wurden, musste zunächst eine Dehydratation erfolgen. Dieses geschah vollautomatisch mittels eines TP1020-Gewebeinfiltrationsautomaten (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH). Dabei ersetzten Ethanollösungen in aufsteigender Konzentration bis schließlich zum reinen Alkohol das Gewebewasser. Anschließend wurde der Alkohol durch das organische Lösungsmittel X-TRA-Solv (MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland, 41-5211-00) aus dem Gewebe verdrängt. Daraufhin wurden die Gewebeblöcke in einer Histokassette (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland, Leica TP1020) positioniert und in einem EG 1160-Einbettungsautomaten (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) in heißes Paraffin überführt. Nach Abkühlen und Aushärten konnte aus den Gewebeblöcken mit Hilfe eines RM2145-Rotationsmikrotom (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) 4 µm Schnitte angefertigt werden. In einem 37 °C warmen Wasserbad wurden die Schnitte mit Hilfe eines

Pinsels entfaltet und anschließend auf einen Objektträger überführt. Dafür wurden entweder unbeschichtete Objektträger (Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland), oder beschichtete Adhäsionsobjektträger (Polysine Slides, Thermo Fisher Scientific Germany BV& Co KG) für immunhistochemische Untersuchungen verwendet. Die Objektträger wurden anschließend bei 60-66 °C für eine Stunde im Ofen getrocknet. Um die histologischen Schnitte mit wässrigen Farbstoffen zu färben, wurde X-TRA-Solv-Lösungsmittel zum entparaffinieren verwendet. Daraufhin folgte eine stufenweise Rehydrierung mit aufsteigenden Ethanolkonzentrationen. Nachdem die unten beschriebenen Färbungen oder Antikörperinkubationen durchgeführt wurden, wurden die Schnitte wieder mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in X-TRA-Solv überführt. Vorsichtig wurde ein Tropfen Eindeckmedium (X-TRA-Kitt, MEDITE GmbH, 41-5219-00) aufgetragen und der Gewebeschnitt mit einem Deckgläschen abgedeckt.

Die in Kryo asservierten Gewebeblöcke wurden mit Hilfe des Tissue-Tek eingebettet und bei -20 °C gelagert.

2.4.2. Hämatoxylin/ Eosin Färbung

Zur quantitativen Auswertung der Nekroseflächen und zur Evaluation morphologischer Charakteristika erfolgte eine Färbung der Präparate mit Hämatoxylin-Eosin (H/E). Das farblose Hämatoxylin wird durch Oxidation und Komplexbildung mit Aluminiumionen zu Hämalaun umgewandelt. Dieser dunkelblaue Farbstoff ist basisch und bindet deshalb an die negativ geladenen, basophilen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren im Zellkern. Daraus folgt eine selektive Darstellung des Zellkernes. Zur Kontrasterhöhung wird die Gegenfärbung mit Eosin, einem sauren Farbstoff, der sich an die acidophilen Proteine des Zytoplasmas lagert und diese rot färbt, durchgeführt.

Die Schnitte wurden für fünf Minuten in die Hämalaunlösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, 109249) gegeben. Anschließend erfolgte das „Bläuen“, ein Vorgang, der der Erhöhung des pH-Wertes dient, denn erst dadurch wird der typisch dunkelblaue Farbton erreicht. Dabei befinden sich die Objektträger für zehn Minuten in lauwarmen Wasser. Anschließend wurde die einminütige Gegenfärbung mit 0,5 % Eosin-Lösung (Merck KGaA) durchgeführt. Somit stellte sich der Zellkern dunkelblau-violett und das Zytoplasma rot dar.

2.4.3. Histochemische Untersuchungen

2.4.3.1. Beta-Galaktosidase Färbung

Im CM1850 Cryostat (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany) wurden die in Tissue-Tek eingefrorenen Tumore in 7 µm dicke Sektionen geschnitten. Anschließend wurden die Schnitte mit Hilfe eines Pinsels plan gezogen und auf einen unbeschichteten Objektträger aufgebracht. Nach einer Trocknung bei Raumtemperatur wurden die Schnitte für zwei Minuten in eiskalte Fixierlösung, bestehend aus 2 ml 0,5 % Glutaraldehyde und 98 ml gepuffertes (pH 7,2), 4 % Formaldehyde, gegeben. Die Fixierlösung wurde mit PBS ausgewaschen. Anschließend wurde die β -Galaktosidase Färbung bei 37 °C für 48 Stunden durchgeführt. Dafür wurde 2 ml einer X-Gal Stock-Lösung (40 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (Sigma Aldrich Chemie GmbH)) zu 78 ml einer Färbelösung (5 mM ferricyanide, 5 mM ferrocyanide, 2 mM MgCl₂ in PBS, pH 7,2) gemischt.

2.4.4. ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit

Der selbstinduzierte Zelltod wurde mit Hilfe des ApopTagPlus Peroxidase in Situ Detection Kit (Millipore, Eschborn, Deutschland, S7100) analysiert. Unter Verwendung der TUNEL (TdT mediated dUTP-biotin nick end labeling) Methode werden DNA-Strangbrüche detektiert.

Durch die Apoptose wird der DNA-Strang durch Endonukleasen in viele Fragmente zerteilt. Dadurch werden an den Bruchenden 3'-OH-Gruppen frei, welche durch das Enzym Terminaldesoxynucleotidyltransferase (TdT) mit Digoxigenin markierten Polydesoxyuridylnukleotiden verknüpft werden. Ein mit einer Peroxidase konjugierter Anti-Digoxigenin Antikörper bindet an diese Nukleotide und anschließend wird ein chromogenes Substrat hinzugefügt. Die Peroxidase katalysiert eine Farbreaktion, die im histologischen Präparat sichtbar wird.

Zunächst wurden die Präparate 15 Minuten lang mit 60 µl Proteinase K (Dako GmbH, S3020) inkubiert, um die Antigenbindungsstellen freizulegen. Anschließend erfolgte ein vierminütiger Waschschrift in destilliertem Wasser. Daraufhin wurde „Peroxidase Blocking Solution“ für fünf Minuten hinzugegeben, um die Aktivität endogener Peroxidasen abzuschwächen. Nach mehrmaligen Spülen mit Wasser wurde 75 ml „Equilibration Buffer“ aufgetragen. Nachdem 55 µl der TdT Enzymlösung hinzugefügt wurde, inkubierte die Probe für eine Stunde bei 37 °C in einer feuchten Kammer.

Anschließend erfolgte eine zehnminütige Behandlung mit „Stop/Wash Buffer“ und das „Anti –Digoxigenin Conjugate“ wurde auf Zimmertemperatur erwärmt. Nachdem die Objektträger für drei Minuten in PBS gewaschen wurden, wurde 65 µl der TdT Enzymlösung aufgetragen und es erfolgte eine einstündige Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37 °C. Anschließend wurden die Objektträger erneut drei Mal in PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Die Farbreaktion wurde gestoppt, indem die Präparate für drei und anschließend fünf Minuten in destilliertem Wasser gewaschen wurden. Es erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämalauen.

2.4.5. Durchführung einer Immunhistochemie

In einer Immunhistochemie binden enzymversetzte Antikörper selektiv an Antigene. Danach wird die Antigen-Antikörper-Bindung durch ein farbiges Reaktionsprodukt sichtbar gemacht. Nach der oben beschriebenen Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten in dem Gewebepuffer Target Retrieval Solution (S1699; Dako Deutschland GmbH) für sieben Minuten bei 700 W zur hitzeinduzierten Antigendemaskierung in eine Mikrowelle gegeben. Nach Abkühlung wurden die Objektträger mehrmals gespült, für fünf Minuten mit der Peroxidase-Blocking Solution (S2023; Dako Deutschland GmbH) behandelt und anschließend erneut gespült. Nun wurde Protein-Block, Serum-Free (X0909; Dako Deutschland GmbH) für 15 Minuten aufgetragen, um unspezifische Bindungen der Antikörper an Gewebeproteine zu verhindern. Die Primärantikörperlösung wurde in Antibody Diluent with Background Reducing Components (S3022; Dako Deutschland GmbH) verdünnt und auf die Objektträger getropft. Über Nacht erfolgte die Inkubation bei 4 °C zur Bindung der primären Antikörper. Die ungebundenen Antikörper wurden am nächsten Tag durch mehrmaliges Spülen entfernt und eine verdünnte Sekundärantikörperlösung für eine Stunde auf die Objektträger aufgebracht. Der Sekundärantikörper ist mit „Horseradish Peroxidasen“ (HRP) konjugiert, welche das Substrat „Liquid DAB+“ (Dako GmbH, K3467) chromogen umsetzten. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde der Zeitpunkt der optimalen Färbung festgestellt und die Reaktion durch Spülen unter Leitungswasser gestoppt. Anschließend erfolgte eine Gegenfärbung in Hämalauen, Übersichtung mit Eindeckmedium und Abdeckung mit einem Deckgläschen.

Tabelle 4: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Antigen	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
BrdU	Monoklonal, Maus-anti-BrdU Antikörper (Dako GmbH, M0744), 50-fache Verdünnung	Ziege-anti-Maus HRP-Antikörper (Dako GmbH, P0447), 100-fache Verdünnung
α -SMA	Polyklonaler Kaninchen-anti-SMA (Abcam, Cambridge, UK, ab5694) 800-fache Verdünnung	Ziege-anti-Kaninchen HRP Antikörper (Dako GmbH, P0448), 100-fache Verdünnung
Kollagen Typ 1	Polyklonale Kaninchen-anti-Collagen-1 Antikörper (Abcam, Cambridge, UK, ab34710), 200-fache Verdünnung	Ziege-anti-Kaninchen HRP-Antikörper (Dako-GmbH, P0448), 100-fache Verdünnung

2.5. PH-Wert Evaluation

Für die visuelle Darstellung des pH-Wertes des murinen pankreatischen Adenokarzinoms wurde eine neue Methode eingeführt. Zunächst wurde die Farbe der Indikatorlösung (Bromothymolblue, SCS GmbH, Bonn, Germany) mittels 1N NaOH adjustiert, bis ein grüner Farbumschlag beobachtet wurde. Die in Kryo asservierten Tumore wurden zunächst mittels des CM1850 Cryostat (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany) und unter mikroskopischer Kontrolle soweit vorgetrimmt, dass ein möglichst großer Querschnitt mit guter Darstellung des zystischen Hohlraums des Tumors erreicht wurde. Anschließend wurden serielle, 10 μ m dicke Sektionen für die HE Färbung und die pH Evaluation angefertigt. Während der erste Schnitt auf mit 1 % bromothymolblue Lösung eingeweichtes, weißes Schreibpapier aufgetragen wurde, wurde der darauf folgende Schnitt in HE gefärbt. Innerhalb von 15 Sekunden wurde ein Foto von dem, auf die pH-Färbelösung aufgetragenen Tumor gemacht, um den Farbumschlag zu dokumentieren. Anschließend diente der Vergleich mit den H/ E Schnitten der Lokalisation bestimmter Areale im Tumor.

In einem weiteren Experiment wurde der pH-Wert der Tumore direkt gemessen. Es wurde die Zystenflüssigkeit des PDAs mit Hilfe einer Spritze abgesaugt und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Das Tumorgewebe wurde zerschnitten, in einem Kryo-Röhrchen in Flüssigstickstoff eingefroren und eine vorgewogene eingefrorene Menge an kleinen Kügelchen hinzugeben. Mittels des Mikro-Dismembrator (B. Braun Biotech International, Melsungen, Germany) wurde das Gewebe im eingefrorenen Zustand zerschlagen. Anschließend wurde die Probe mit 2000 rpm zentrifugiert, um die

Gewebeflüssigkeit von dem Gewebe zu trennen. Der Überstand wurde abgenommen und der pH-Wert mit Hilfe des RapidLab Analyzer (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Germany) gemessen.

2.6. Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung erfolgte unter Verblindung der Gruppenzugehörigkeit am Olympus BX51 Mikroskop (Olympus Corporation, Tokio, Japan). Die histologischen Fotos wurden mit der Software cell^D 2.5 (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Hamburg, Deutschland) angefertigt. Es wurden jeweils 10, auf die ganze Zirkumferenz des Tumors verteilte Gesichtsfelder mit Hilfe eines Rasterokulars betrachtet. Für die Auswertung der desmoplastischen Schicht wurden 20 Gesichtsfelder ausgewertet. Für alle Untersuchungen vom Tumorrinneren und Tumorrandbereich wurden in BrdU-Immunhistochemie, Apoptag, und Nekroseflächen in Bereichen von 0-210 μm und 360-570 μm entfernt von der desmoplastischen Schicht ausgewertet. Dabei wurde das Tumorrinnere mit 360-570 μm Distanz von der desmoplastischen Schicht definiert. Der Tumorrand wurde mit einem Abstand von 0-210 μm zur desmoplastischen Schicht festgelegt. Die Evaluation der BrdU, α -SMA, Kollagen-1, Beta-Galaktosidase- und ApopTag Präparate erfolgte in 400-facher Vergrößerung. Für die planimetrische Analyse nekrotischer Tumoreale wurden pro Präparat in 200-facher Vergrößerung 10 zufällig ausgewählte Bereiche fotografiert und mittels Adobe Photoshop CS5 (Adobe, San Jose, Kalifornien, USA) ausgewertet. Übersichtsaufnahmen der H/E-Präparate wurden in 10-facher Vergrößerung (Axioskop 400, AxioCam MRc5, Carl Zeiss, Jena) aufgenommen.

2.7. Statistik

Mit Hilfe von SigmaPlot12 (Systat Software, Inc., San Jose, Kalifornien, USA) wurden alle Diagramme sowie alle Testungen auf Signifikanz durchgeführt. Die Linienstreudiagramme stellen den Mittelwert und die Standardabweichung dar. Die Boxplots zeigen den Median sowie das 25. und 75. Perzentil in Form einer Box und das 10. und 90. Perzentil als Whisker. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des Mann-Whitney rank-sum Tests berechnet. Um die Akkumulation des Alpha-Fehlers zu vermeiden, wurde die Bonferroni Korrektur bei multiplen Vergleichen berücksichtigt. Unterschiede mit $p \leq 0,05$ geteilt durch die Anzahl sinnvoller Vergleiche wurden als signifikant bezeichnet. Unterschiede mit $p \leq 0,08$ geteilt durch die Anzahl sinnvoller Vergleiche wurden als Tendenz bezeichnet.

3. Ergebnisse

3.1. Hemmung der Zellproliferation

Um zu überprüfen, in wie weit Gemcitabin und Metformin die Proliferation der Karzinomzellen im Tumorinneren und Tumorrandbereich hemmen, wurde die Zellproliferation mittels BrdU-Immunhistochemie untersucht. In der histologischen Untersuchung konnte ein Großteil BrdU-negativer Karzinomzellen neben einzelnen BrdU-positiven Karzinomzellen im Tumorinneren (Abb. 3a) und Tumorrandbereich (Abb. 3b) dargestellt werden.

Im Tumorinneren reduzierte die Behandlung mit Gemcitabin, mit Gemcitabin und Metformin den Prozentsatz proliferierender Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sham) stark (Abb. 3c). Während durch die Gemcitabintherapie eine signifikante Reduktion der Proliferation beobachtet wurde, führte die Kombinationsbehandlung mit Gemcitabin und Metformin nur zu einer tendenziellen Reduktion des Prozentsatzes proliferierender Karzinomzellen (Abb. 3c).

Im Tumorrandbereich reduzierte die Behandlung mit Gemcitabin plus Metformin oder Metformin den Prozentsatz proliferierender Karzinomzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sham) signifikant (Abb. 3d). Des Weiteren konnte eine signifikante Reduktion des Prozentsatzes proliferierender Zellen durch eine Gemcitabin- und Metformin-Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Gemcitabin-Monotherapie beobachtet werden. Somit konnte ein additiver antiproliferativer Effekt auf die Zellen des Tumorrandbereiches durch eine Gemcitabin und Metformin Kombinationsbehandlung beobachtet werden (Abb. 3d). Diese Daten belegen, dass Gemcitabin eine starke antiproliferative Wirkung im Tumorinneren besitzt. Dem gegenüber vermittelt Metformin eine antiproliferative Wirkung im Tumorrandbereich. Die stärkste Reduktion der Proliferation wurde im Tumorrandbereich durch die Kombinationstherapie aus Gemcitabin und Metformin erreicht.

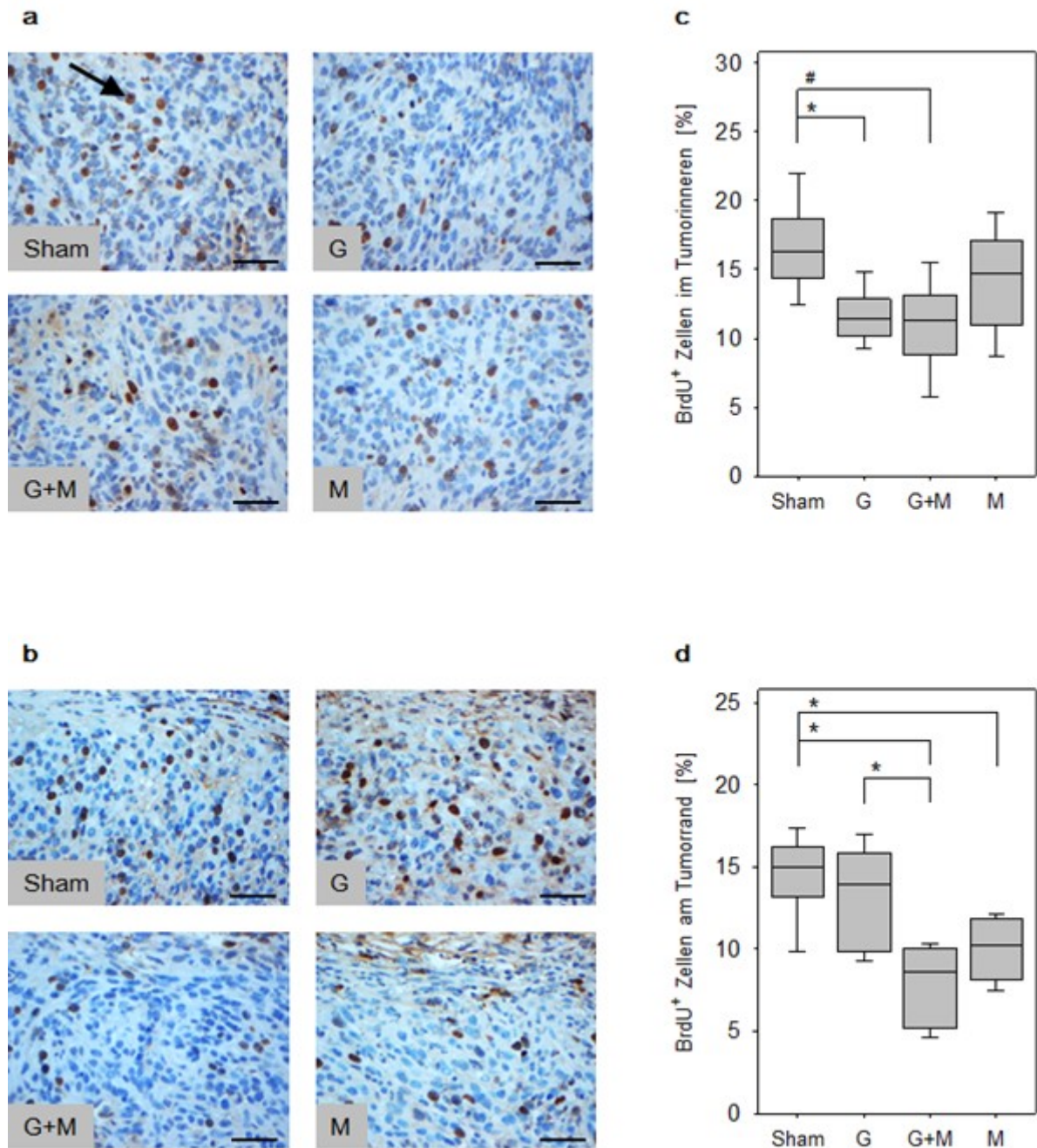


Abbildung 3: Hemmung der Zellproliferation. Untersucht wurde der Einfluss von PBS (Sham), Gemcitabin (G), Gemcitabin und Metformin (G+M) oder Metformin (M) auf die Proliferation von PDA-Zellen in vivo. Mittels BrdU-Immunhistochemie wurden proliferierende Karzinomzellen (↑) im Tumorrinneren (a) und am Tumorrang (b) dargestellt. Der Prozentsatz der sich in Proliferation befindenden Zellen im Tumorrinneren (c) und am Tumorrang (d) wurde quantifiziert. Die Tumore wurden von Florian Bürtin asserviert. Signifikante Unterschiede mit * $p \leq 0,009$, tendenzielle Unterschiede mit # $p = 0,015$. Mann-Whitney Rank Sum Test mit Bonferroni-Korrektur. $n = 8$ (Sham, G+M), $n = 7$ (G, M). Analysiert wurde ein 0-210 μm (Tumorrangbereich) und ein 360-570 μm (Tumorrinneres) von der desmoplastischen Reaktion entfernter Gewebereich. Balken = 100 μm

3.2. Geringer Einfluss der Therapie auf Nekrose im Tumorinneren und –randbereich

Um den Einfluss der Therapeutika Gemcitabin und Metformin auf den Zelltod im Tumorinneren (Abb. 4a) und Tumorrandbereich (Abb. 4b) zu evaluieren, wurden die nekrotischen Flächen mittels H/E-Färbung dargestellt und ihr Anteil am Gesamttumorgewebe planimetrisch ausgewertet. Die nekrotischen Flächen waren dabei Detritus reiche, durch einen Verlust der Zytoarchitektur und fehlender Darstellbarkeit der Zellkerne, gekennzeichnete Areale.

Im Tumorinneren zeigten sich nach Behandlung mit Gemcitabin, Gemcitabin und Metformin oder Metformin nur geringe Unterschiede in der Quantität nekrotischer Anteile im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sham). Lediglich nach Metforminbehandlung konnte ein moderat gesteigerter Anteil nekrotischer Areale beobachtet werden, wobei dieser Unterschied nicht signifikant war (Abb. 4c).

Die Quantifizierung des Zelltodes am Tumorrand erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (Sham) und den Behandlungsgruppen. Allerdings konnte ein signifikant größerer Anteil an Nekroseflächen nach Metformin Monotherapie im Vergleich zur Gemcitabin- und Metformin Kombinationsbehandlung beobachtet werden (Abb. 4d).

Im Tumorinneren (6,0/4,0-8,4; Median/ Interquartilsabstand) zeigte sich ein signifikant ($p = 0,021$) größerer Prozentsatz nekrotischer Areale verglichen mit dem Tumorrandbereich (3,2/2,5-4,7; Median/ Interquartilsabstand).

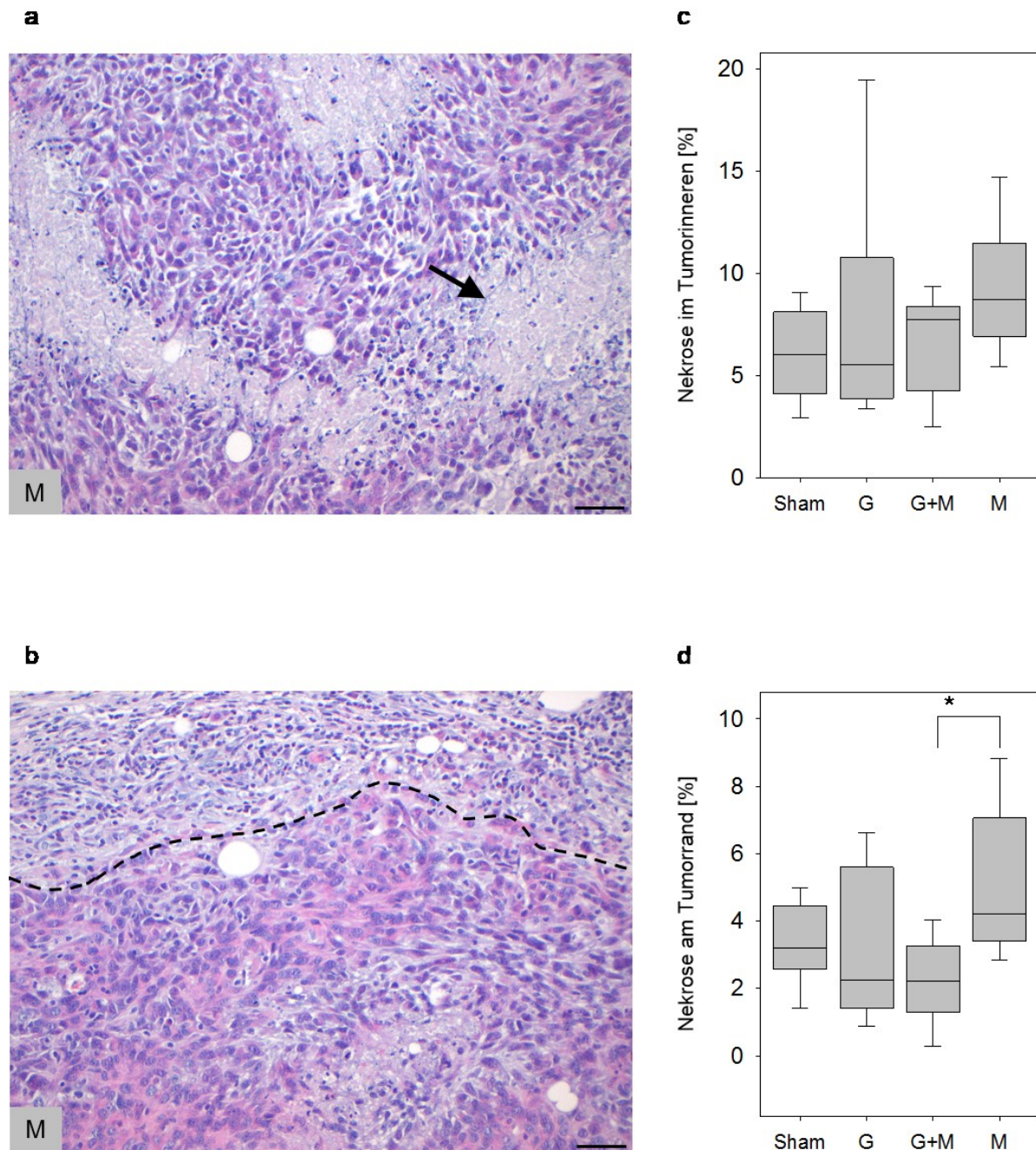


Abbildung 4: Geringer Einfluss der Therapien auf Nekrose. Untersucht wurde der Einfluss von PBS (Sham), Gemcitabin (G), Gemcitabin und Metformin (G+M) oder Metformin (M) auf nekrotische Areale (↑) im Tumorinneren (a) und -randbereich (b). Der relative Anteil der nekrotischen Flächen an der Gesamtfläche wurde im Tumorinneren (c) und am Tumorrang (d) berechnet. Die Tumore wurden von Florian Bürtin asserviert. Signifikante Unterschiede mit * $p < 0,006$. Mann-Whitney Rank Sum Test mit Bonferroni-Korrektur. $n = 8$ (Sham, G, G+M), $n = 7$ (M). Analysiert wurde ein 0-210 μm (Tumorrangbereich) und ein 360-570 μm (Tumorinneres) von der desmoplastischen Reaktion (---) entfernter Gewebereich. Balken = 50 μm

3.3. Geringer Einfluss der Therapien auf Apoptose

Da kaum eine Beeinflussung der Nekrose durch die Therapeutika beobachtet werden konnte, wurde die Apoptose als weitere Form des Zelltodes untersucht. Dabei wurde die proapoptotische Wirkung von Gemcitabin, Gemcitabin und Metformin oder Metformin im Tumorrinneren (Abb. 5a) und am Tumorrand (Abb. 5b) des PDAs untersucht, um in den Kohorten eine Steigerung des selbst-induzierten Zelltodes feststellen zu können. In der Immunhistochemie können apoptotische Zellen mittels Apop Tag Kits anhand ihres braunen Zellkernes identifiziert werden, während Zellkerne nicht-apoptotischer Zellen Hämalaun blau gefärbt werden (Abb. 5a und b).

Im Inneren des PDAs konnte nach Behandlung mit Gemcitabin, Gemcitabin und Metformin oder Metformin keine signifikant gesteigerte Apoptose im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sham), festgestellt werden (Abb. 5c).

Auch am Tumorrand konnte in den einzelnen Behandlungsgruppen keine signifikante Zunahme der Apoptose, verglichen mit der Kontrollgruppe (Sham) beobachtet werden (Abb. 5d).

Demzufolge führen Metformin und Gemcitabin zu keiner relevanten Induktion der Apoptose in diesem Tierversuch.

In unserem orthotopen Tiermodell des PDA konnten wir im Tumorrinneren (10,3/8,7-15,6; Median/ Interquartilsabstand in Apoptag⁺-Zellen/Gesichtsfeld) einen signifikant ($p < 0,001$) größeren Prozentsatz apoptotischer Zellen verglichen mit dem Tumorrandbereich (4,7/3,7-5,7; Median/ Interquartilsabstand in Apoptag⁺-Zellen/Gesichtsfeld) feststellen.

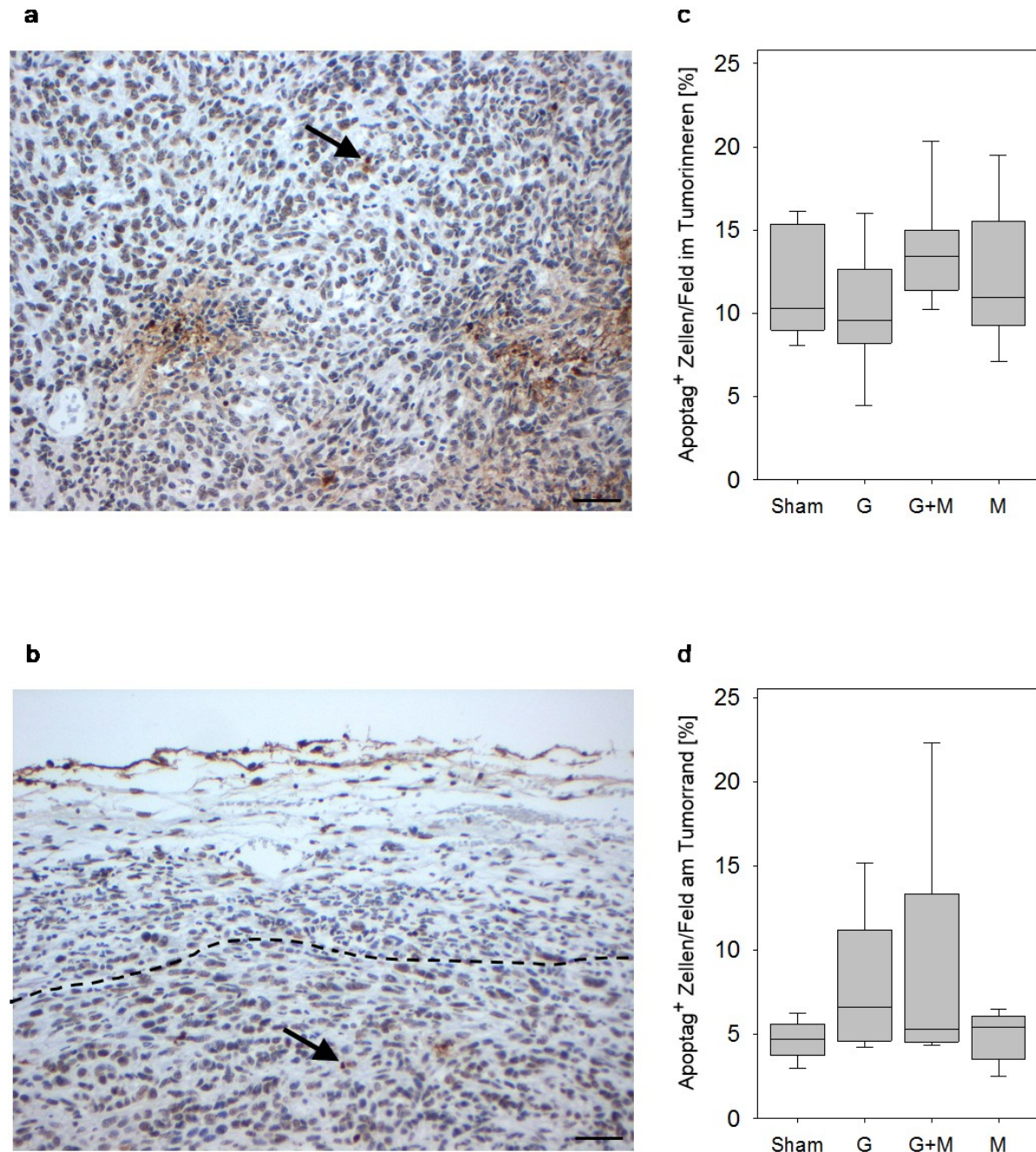


Abbildung 5: Geringer Einfluss der Therapien auf Apoptose. Untersucht wurde der Einfluss von PBS (Sham), Gemcitabin (G), Gemcitabin und Metformin (G+M) oder Metformin (M) auf die Anzahl ApopTag positiver Zellen (↑) im Tumorrinneren (a) und am Tumorrang (b) mittels ApopTag Kit. Der Prozentsatz der ApopTag positiven Zellen im Tumorrinneren (c) und am Tumorrang (d) wurde quantifiziert. Die Tumore wurden von Florian Bürtin asserviert. Analysiert wurde ein 0-210 µm (Tumorrangbereich) und ein 360-570 µm (Tumorrinneres) von der desmoplastischen Reaktion (---) entfernter Gewebereich, n = 8 (Sham, G, G+M), n = 7 (M). Balken = 100 µm

3.4. Minimaler Einfluss von Therapeutika, Inflammation und Diabetes auf die desmoplastische Reaktion

Charakteristische Eigenschaft der asservierten und untersuchten PDAs ist neben dem Vorhandensein einer Zyste im Tumorinneren vor allem die Ausbildung einer intensiven desmoplastischen Reaktion, die die Karzinomzellen umgibt. Die desmoplastische Reaktion wird überwiegend von aktivierten Pankreatischen Sternzellen gebildet, welche EZM-Proteine sezernieren, was zu einer Fibrosierung führt. Dementsprechend besteht die desmoplastische Reaktion des PDAs u.a. aus kollagenreichem Bindegewebe und Alpha-Smooth-Muscle-Actin exprimierenden Zellen.

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die desmoplastische Reaktion wurde eine Kollagen-1 Immunhistochemie zur Darstellung der kollagenen Fasern durchgeführt. In dieser stellen sich die kollagenen Fasern der desmoplastischen Reaktion braun dar (Abb. 6a). Des Weiteren konnte mittels Alpha-Smooth-Muscle-Actin Immunhistochemie eine Darstellung der aktivierten Pankreatischen Sternzellen erfolgen. Die desmoplastische Reaktion erscheint in dieser Darstellungsmethode rot (Abb. 6b).

Zunächst wurde mit der Untersuchung des Einflusses von chronischer Inflammation (Cer) und Diabetes mellitus (obese) die klassischen Stimulatoren der Desmoplasie im Pankreas untersucht. Weder bei chronischer Inflammation noch bei Diabetes konnte eine signifikante Zunahme der desmoplastischen Reaktion in Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe beobachtet werden (Abb. 6c).

Anschließend wurde der Einfluss von Gemcitabin und Metformin auf die desmoplastische Reaktion untersucht. Sowohl die Behandlung mit Gemcitabin, Metformin, der Kombinationsbehandlung mit Gemcitabin und Metformin oder Metformin führte zu keiner signifikanten Beeinflussung der desmoplastischen Reaktion (Abb. 6d).

Auf Grundlage dieser Daten konnte keine Beeinflussung der desmoplastischen Reaktion durch chronische Inflammation, Diabetes, Gemcitabin und Metformin festgestellt werden.

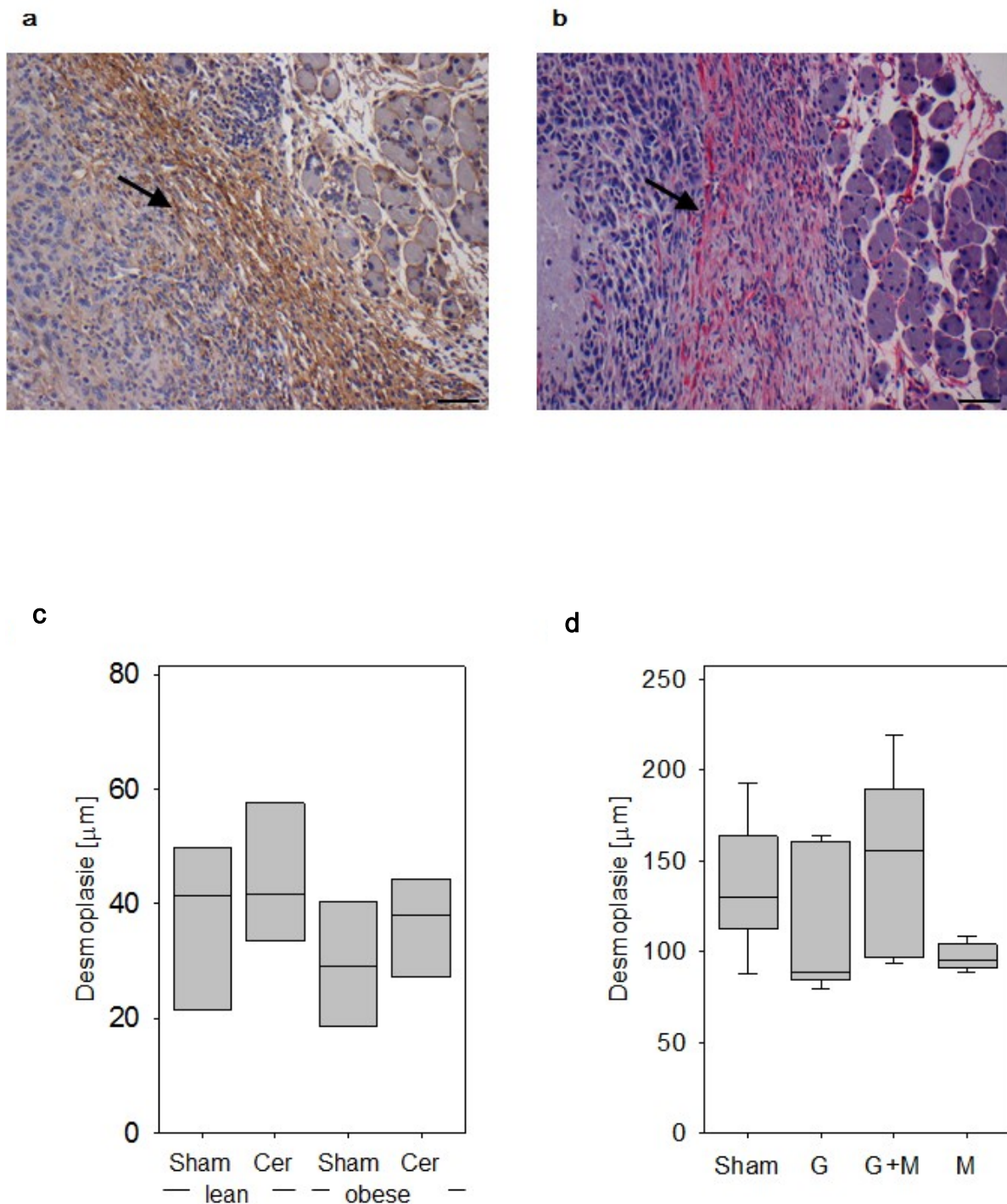


Abbildung 6: Minimaler Einfluss von Therapeutika, Inflammation und Diabetes auf die desmoplastische Reaktion. Färbung der desmoplastischen Reaktion (\uparrow) mittels Kollagen-1 Immunhistochemie (a). Färbung der desmoplastischen Reaktion mittels Alpha-Smooth-Muscle-Actin-Immunhistochemie (b). Quantifizierung des Einflusses von chronischer Pankreatitis (Cer) und Diabetes mellitus (obese) auf die desmoplastische Reaktion (c). Untersuchung des Einflusses von PBS (Sham), Gemcitabin (G), Gemcitabin und Metformin (G+M) oder Metformin (M) auf die desmoplastische Reaktion des PDAs (d). Die Tumore wurden von Tobias Radecke (c) und Florian Bürtin (d) asserviert. $n = 4$ (c), $n = 5$ (d). Balken = $100 \mu\text{m}$

3.5. Aktivität des Wnt-Signaltransduktionsweges

Die Aktivität und Funktion der Wnt-Signaltransduktion im PDA ist zur Zeit nicht abschließend geklärt. Da eine Interaktion zwischen Karzinomzellen und Tumorstroma über Wnt-Signaltransduktion diskutiert wird, führten wir eine β -Galaktosidase Histochemie durch. Eine Aktivität des Signalweges wird so durch eine charakteristische blaue Färbung darstellbar. Zunächst wurde eine Positiv- und Negativkontrolle zur Verifikation der Methodik durchgeführt.

Als Positivkontrolle dienten Dünndarmpräparate von Axin2^{+/lacZ}-Mäusen. In der Positivkontrolle wurde eine, in den Krypten betonte Aktivität der Wnt-Signaltransduktion beobachtet, welche durch eine blaue Färbung charakterisiert ist (Abb. 7a). Als Negativkontrolle dienten Dünndarmpräparate von Axin2^{+/+}-Mäusen. Bei diesen konnte mittels β -Galaktosidase Histochemie keine Färbung beobachtet werden (Abb. 7b).

Anschließend wurde die Aktivität der Wnt-Signaltransduktion im PDA untersucht. Dabei stellte sich in acht Tumoren der Axin2^{+/lacZ}-Mäuse eine ringförmige Anordnung Wnt-positiver Zellen dar. Diese Schicht stimmte jedoch nicht mit der Schicht aus Tumor-assoziierten Fibroblasten (TAF) am Tumorrand überein, sondern befand sich innerhalb des Tumors (Abb. 7c). Der Zeitpunkt der Tumorentnahme schien keinen Einfluss zu haben, denn es konnte kein wesentlicher Unterschied im prozentualen Anteil ringförmig angeordneter Zellen zwischen den beiden Entnahmezeiten festgestellt werden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Aktivität der Wnt-Signaltransduktion bei Tumoren in Axin2^{+/lacZ}-Mäusen

Zeitpunkt der Tumorexstirpation	Tag 14	Tag 27
Anzahl analysierter Tumore	n = 8	n = 7
Anzahl analysierter Tumore mit ringförmiger β -Galaktosidase Färbung	n = 2	n = 2
Prozentualer Anteil PDA-Tumore mit ringförmiger β -Galaktosidase Färbung	25	28

Außerdem konnte die Aktivität der Wnt-Signaltransduktion bei einzelnen Zellen beobachtet werden (Abb. 7d).

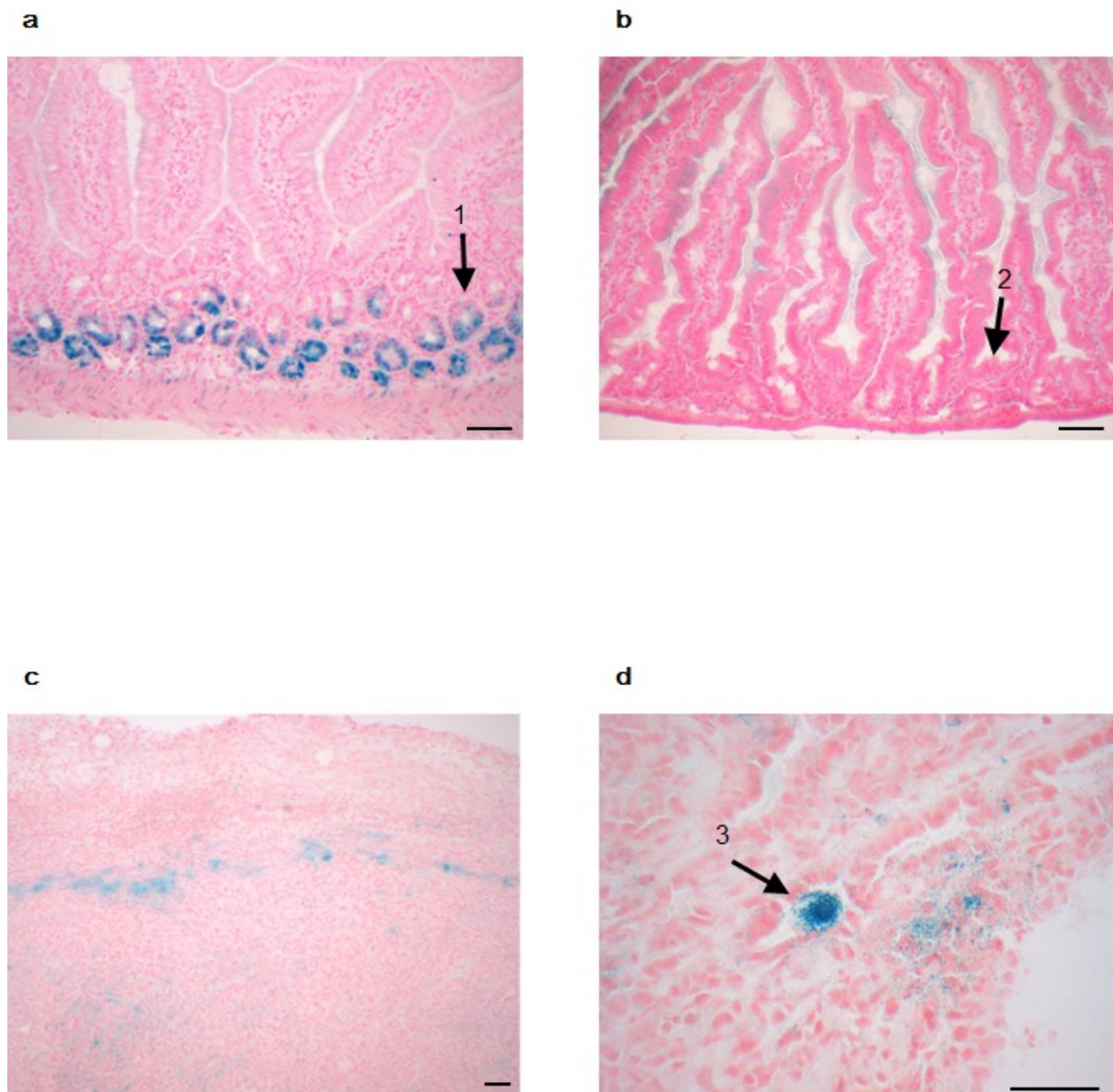


Abbildung 7: Evaluation der Aktivität des Wnt-Signaltransduktionsweges. Analyse der Wnt-Signaltransduktion mittels histochemischer Färbung der β-Galaktosidase. Aktivität des Wnt-Signaltransduktionsweges in der Positivkontrolle, in den Krypten des Darms (1), bei Axin2^{+/lacZ}-Mäusen (a) und keine Aktivität in der Negativkontrolle, den Krypten des Darms (2), bei Axin2^{+/+}-Mäusen (b). Ringförmige Anordnung Wnt-positiver Zellen im PDA (c) bei Axin2^{+/lacZ}-Mäusen. Aktivität der Wnt-Signaltransduktion bei einzelnen Zellen (3, d). Balken = 100 μm

3.6. Analyse der Genablation von Axin2

Nachdem die Aktivität der Wnt-Signaltransduktion in Tumoren von Tieren mit einer heterogenen Ablation des Axin2 Gens ($Axin2^{+/lacZ}$) beobachtet wurde, untersuchte ich die Aktivität der Wnt-Signaltransduktion in $Axin2^{lacZ/lacZ}$.

Als Positivkontrolle wurde zunächst eine β -Galaktosidase Histochemie an Dünndarmpräparaten bei $Axin2^{lacZ/lacZ}$ durchgeführt. Die beobachtete Aktivität der Wnt-Signaltransduktion war nicht nur auf die Krypten beschränkt, sondern konnte auch in apikalen Bereichen einiger Darmzotten nachgewiesen werden (Abb. 8a). Diese Beobachtung unterscheidet sich von der, auf die Darmkrypten beschränkte Aktivität bei $Axin2^{+/lacZ}$ -Mäusen. Ebenso wie bei $Axin2^{+/lacZ}$ konnte auch in den Tumoren der $Axin2^{lacZ/lacZ}$ -Mäuse eine ringförmige Färbung beobachtet werden (Abb. 8b). Es konnte kein relevanter Unterschied in Quantität und Qualität dieser ringförmigen Wnt-Aktivität durch eine Axin2-Genablation beobachtet werden (Tabelle 6). Somit scheint Axin2 für die Ausbildung der β -Galaktosidase positiven, ringförmigen Komplexe nicht von Bedeutung zu sein.

Tabelle 6: Aktivität der Wnt-Signaltransduktion bei Tumoren in $Axin2^{+/lacZ}$ - und $Axin2^{lacZ/lacZ}$ -Mäusen zum späten Zeitpunkt

	$Axin2^{+/lacZ}$	$Axin2^{lacZ/lacZ}$
Anzahl analysierter Tumore	n = 11	n = 5
Anzahl analysierter Tumore mit ringförmiger β -Galaktosidase Färbung	n = 6	n = 3
Prozentualer Anteil PDA-Tumore mit ringförmiger β -Galaktosidase Färbung	54	60

Zur Evaluation des Einflusses der Axin2-Genablation auf das Tumorstadium wurde das Tumorgewicht der Kohorte ohne Axin2 Genablation ($Axin2^{lacZ/lacZ}$) mit der Kohorte mit Axin2 Genablation ($Axin2^{+/lacZ}$ und $Axin2^{+/+}$) verglichen. Es zeigte sich kein Unterschied im Tumorgewicht durch Axin2-Genablation (Abb. 8c). Wnt-Signaltransduktion scheint somit keinen wesentlichen Einfluss auf das Tumorgewicht zu haben.

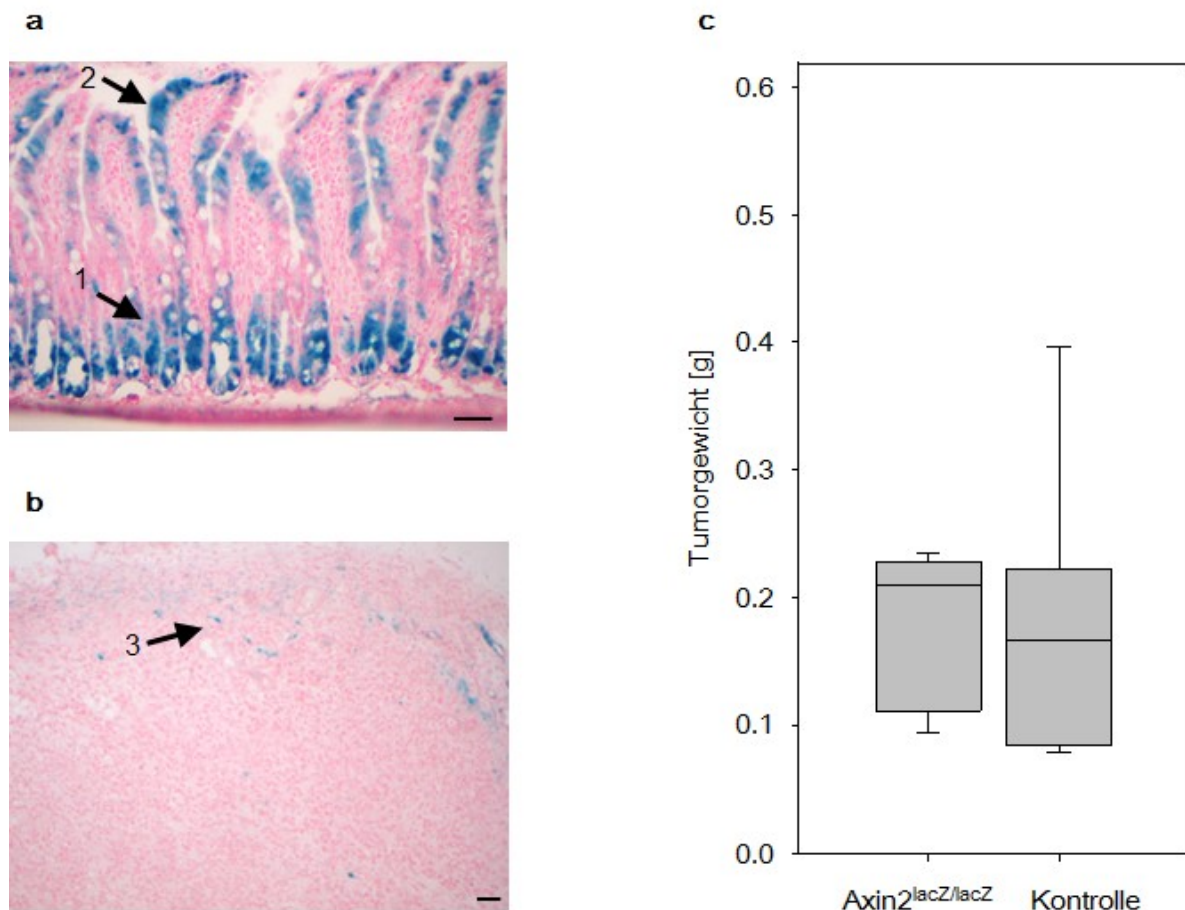


Abbildung 8: Analyse der Genablation von Axin2. Untersuchung der Wnt-Signaltransduktion mittels histochemischer Färbung der β -Galaktosidase. Aktivität des Wnt-Signalweges in Krypten (1) und Zotten (2) des Darms bei Axin2^{lacZ/lacZ}-Mäusen (a) sowie Färbung (3) im PDA bei Axin2^{lacZ/lacZ}-Mäusen (b). Untersuchung des Einflusses der Genablation von Axin2 auf das Tumorgewicht (c). n = 5 (Axin2^{lacZ/lacZ}), n = 9 (Kontrolle: Axin2^{+/lacZ} und Axin2^{+/+}). Balken = 100 μ m

3.7. Einfluss der Glukosekonzentration auf die Wirksamkeit von Therapeutika

Das PDA ist durch eine große intratumorale Heterogenität charakterisiert, welche sich u.a. in unterschiedlichen Nährstoffversorgungen der Karzinomzellen äußert. Um die unterschiedlichen Nährstoffversorgungen in einem in vitro Modell zu simulieren, evaluierten wir den Einfluss verschiedener Glukosekonzentrationen auf die Zellproliferation und den Zelltod von Karzinomzellen. Zur Untersuchung der Nährstoffbedingungen und deren Einfluss auf die Zellproliferation im Inneren des Tumors, wurde ein BrdU-ELISA nach Kultivierung der 6606PDA Zellen mit 0,5 g/l Glukosemedium durchgeführt (Abb. 9a).

Die Inkubation der Zellen mit 0,1 μ M Gemcitabin, 0,1 μ M Gemcitabin und 20 mM Metformin oder in 20 mM Metformin führte zu einer signifikanten Reduktion der BrdU-

Inkorporation im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sham). Des Weiteren führte die Inkubation mit der Kombination aus 0,1 μM Gemcitabin und 20 mM Metformin zu einer signifikant reduzierten BrdU-Inkorporation im Vergleich zur Inkubation in 0,1 μM Gemcitabin (Abb. 9a).

Zum Vergleich wurde eine Kultivierung der Karzinomzellen bei 4,5 g/l Glukose im Nährstoffmedium durchgeführt. Die Behandlung mit 0,1 μM Gemcitabin führte unter diesen Bedingungen zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation. Ebenso verhielt es sich mit der Kombinationsbehandlung der Karzinomzellen mit Gemcitabin und Metformin. Im Gegensatz zur Kultivierung mit 0,5 g/l Glukose hatte die Behandlung mit Metformin bei 4,5 g/l Glukose einen statistisch nicht signifikanten Einfluss auf die Proliferation (Abb. 9b).

Anschließend wurde der Einfluss der Glukosekonzentration des Nährmediums auf den Zelltod bei Therapie mit Gemcitabin, Gemcitabin und Metformin oder Metformin untersucht. Dabei wurde bei Kultivierung mit 0,5 g/l Glukose ein signifikant höherer Zelltod durch Therapie mit allen Therapeutika im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet. Die stärkste Zunahme des Zelltodes wurde durch Gemcitabin und Metformin- Kombinationstherapie sowie durch Metformin-Monotherapie beobachtet. Außerdem wurde unter der Kombinationstherapie mit Gemcitabin und Metformin ein signifikant verstärkter Zelltod als unter Gemcitabin-Monotherapie beobachtet (Abb. 9c).

Bei Inkubation in 4,5 g/l glukosehaltigem Nährmedium wurde durch die Behandlung mit Gemcitabin sowie unter der Kombinationsbehandlung mit Gemcitabin und Metformin ein signifikant erhöhter Zelltod im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sham) beobachtet. Dabei zeigte die Gemcitabin-Monotherapie einen deutlich stärkeren Effekt. Der Gemcitabin vermittelte Zelltod war signifikant erhöht verglichen mit dem unter Gemcitabin und Metformin Kombinationstherapie beobachteten Zelltod (Abb. 9d).

Dementsprechend ist der durch Metformin vermittelte Effekt auf Zellproliferation und Zelltod bei niedriger Glukosekonzentration erhöht, während die durch Gemcitabin vermittelten Effekte weniger stark von der Glukosekonzentration abhängig sind.

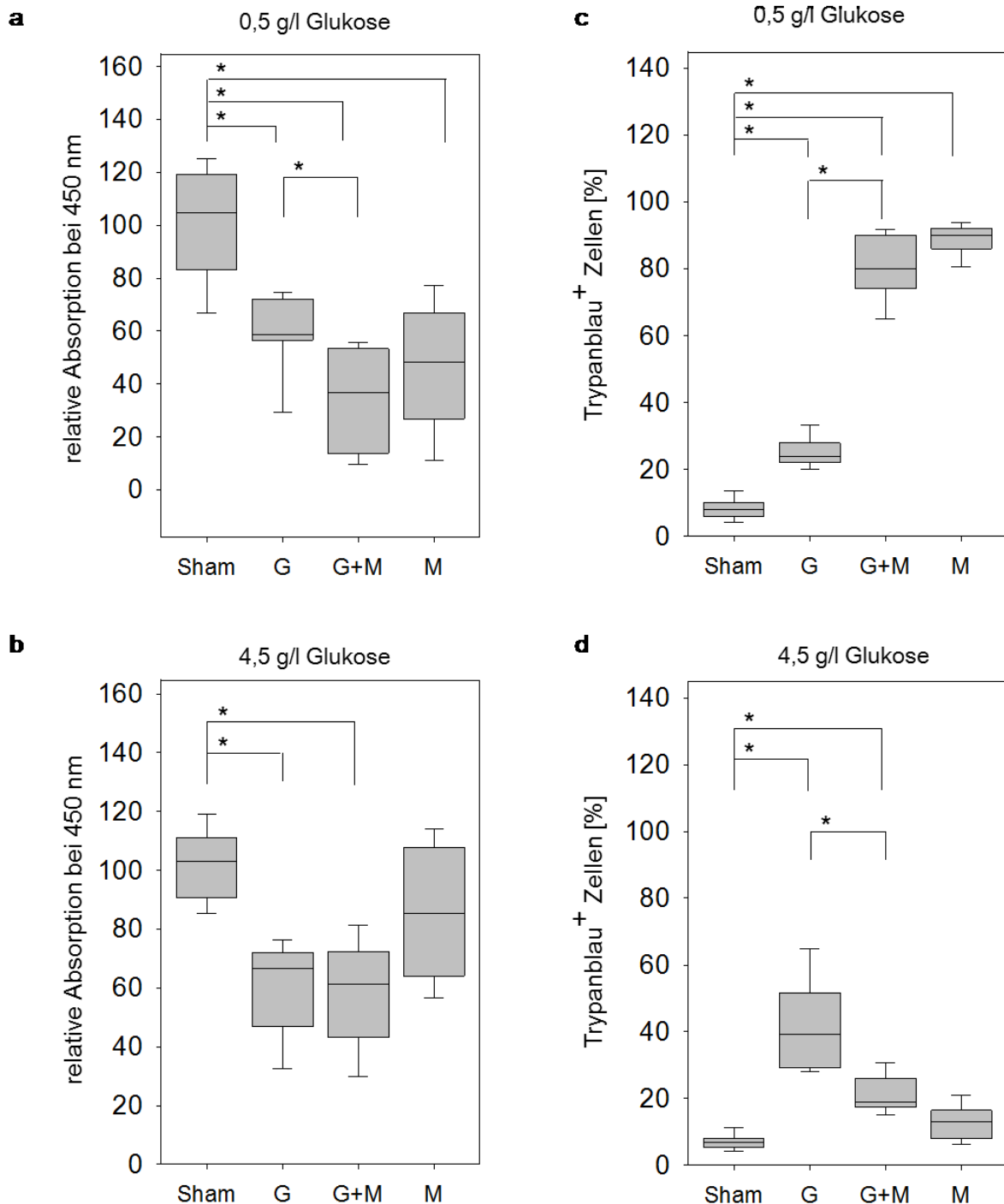


Abbildung 9: Einfluss der Glukosekonzentration auf die Wirksamkeit von Therapeutika. Behandlung ohne Therapeutika (Sham) oder mit Gemcitabin (G), Gemcitabin und Metformin (G+M) oder Metformin (M). Quantifizierung der Zellproliferation mittels BrdU-ELISA bei Kultivierung mit 0,5 g/l- (a) und 4,5 g/l Glukose im Medium (b). Evaluation des Zelltodes mittels Trypanblau Assay bei 0,5 g/l- (c) und 4,5 g/l Glukose im Medium (d). Signifikante Unterschiede mit * $p \leq 0,007$. Mann-Whitney Rank Sum Test mit Bonferroni-Korrektur. BrdU: $n = 10$ (a), $n = 9$ (b), Trypanblau: $n = 6$ (c), $n = 7$ (d). Ergänzt mit Daten von Florian Bürtin.

3.8. Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Wirksamkeit von Therapeutika

Durch das schnelle Tumorwachstum bedingt, beherbergt das PDA Gewebeareale, deren Entfernung zur arteriellen Versorgung stark variiert. Um den Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen auf die Tumorzellproliferation und den Tumorzelltod bei Behandlung mit Gemcitabin, Gemcitabin und Metformin oder Metformin zu untersuchen, führte ich BrdU-ELISAs und Trypan Blau Assays sowohl unter normalen Sauerstoffbedingungen als auch unter Hypoxie durch.

Zunächst erfolgte die Analyse der Zellproliferation von Karzinomzellen bei Normoxie. Dafür erfolgte die Inkubation in 0,1 μ M Gemcitabin, 0,1 μ M Gemcitabin und 20 mM Metformin oder in 20 mM Metformin. Unter normoxischen Bedingungen führte sowohl die Inkubation mit Gemcitabin als auch mit Gemcitabin und Metformin zu einer signifikanten Reduktion der BrdU-Inkorporation und damit der Proliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sham). Der stärkste Effekt konnte in der Gemcitabingruppe beobachtet werden. Es konnte eine tendenziell erniedrigte BrdU-Inkorporation durch die Gemcitabin-Monobehandlung verglichen mit der Kombinationsbehandlung aus Gemcitabin und Metformin festgestellt werden. Ebenso zeigte die Kombinationsbehandlung aus Gemcitabin und Metformin eine tendenziell stärkere Reduktion der Inkorporation als die Behandlung mit Metformin (Abb. 10a).

Zur Imitierung hypoxischer Kulturbedingungen wurden die Karzinomzellen für 72 Stunden in einem Inkubator mit 1 % Sauerstoff kultiviert. Es erfolgte die Inkubation in 0,1 μ M Gemcitabin, 0,1 μ M Gemcitabin und 20 mM Metformin oder in 20 mM Metformin. Erneut zeigte sich eine signifikante Reduktion der Proliferation durch Gemcitabin und durch die Kombinationsbehandlung Gemcitabin und Metformin, wobei Gemcitabin den stärksten Effekt erzielte, verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Kombinationsbehandlung mit Gemcitabin und Metformin zeigte einen tendenziell stärkeren Einfluss auf die Reduktion der Zellproliferation als die Metforminbehandlung (Abb. 10b).

Beim Vergleich der Therapeutikaeffekte auf die Zellproliferation unter Normoxie und Hypoxie konnten somit keine relevanten Unterschiede festgestellt werden.

Zur Untersuchung des therapeutikabezogenen Zelltods unter Normoxie und Hypoxie wurden Trypan-Blau Assays nach entsprechenden Kulturbedingungen durchgeführt. Es erfolgte die Inkubation in 0,1 μ M Gemcitabin, 0,1 μ M Gemcitabin und 20 mM

Metformin oder in 20 mM Metformin. Zunächst erfolgte die Untersuchung des Zelltods unter Normoxie. Die Behandlung der 6606PDA Zellen mit Gemcitabin oder Gemcitabin plus Metformin führte zu einem signifikant erhöhten Prozentsatz toter Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 10c).

Die Metforminbehandlung führte zu einem tendenziell erhöhten Zelltod im Vergleich zur Kontrollgruppe. Verglichen mit der Metformin Behandlungsgruppe konnte bei der Kombination von Gemcitabin und Metformin ein signifikant erhöhter Prozentsatz toter Zellen beobachtet werden (Abb. 10c).

Unter hypoxischen Bedingungen wurde bei Inkubation der Karzinomzellen sowohl mit Gemcitabin als auch mit Gemcitabin und Metformin ein signifikant erhöhter Zelltod verglichen mit der Kontrollgruppe festgestellt, wobei der Gemcitabin-induzierte Effekt signifikant größer war als der Effekt der Kombinationstherapie mit Gemcitabin und Metformin. Außerdem war der Gemcitabin plus Metformin vermittelte Prozentsatz toter Zellen signifikant höher als der durch Metformin vermittelte (Abb. 10d).

Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass die Sauerstoffkonzentration nur einen vernachlässigbar geringen Einfluss auf die Gemcitabin- und Metforminwirkung in Bezug auf die Zellproliferation und den Zelltod besitzt.

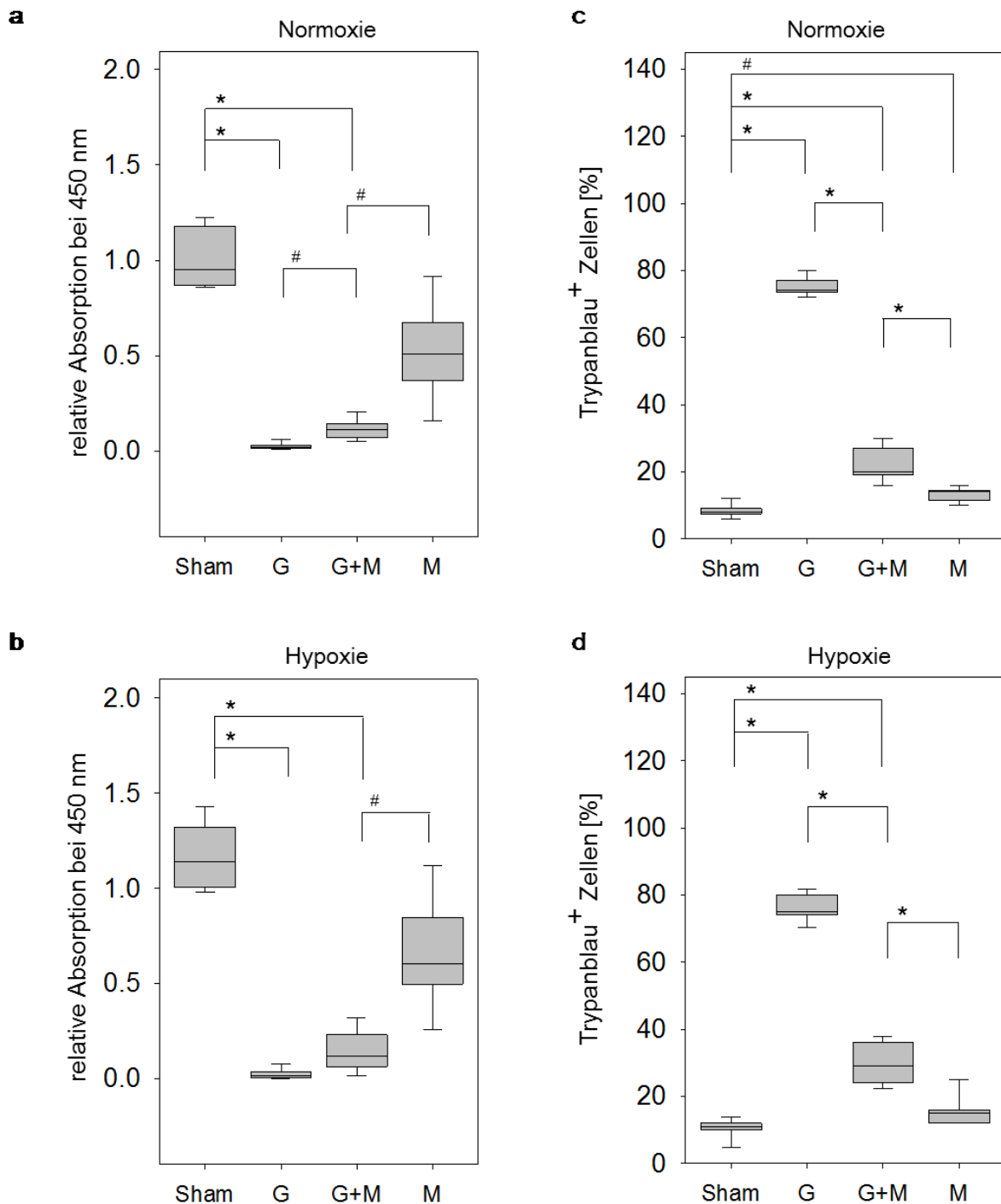


Abbildung 10: Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Wirksamkeit von Therapeutika. Behandlung ohne Therapeutika (Sham) oder mit Gemcitabin (G), Gemcitabin und Metformin (G+M) oder Metformin (M). Die Zellproliferation wurde mittels BrdU-ELISA bei Normoxie (a) und Hypoxie bei Inkubation mit 1 % Sauerstoff (b) gemessen. Der Zelltod wurde mittels Trypanblau-Assay ermittelt und der prozentuale Anteil Trypanblau positiver Zellen bei Normoxie (c) und Hypoxie (d) quantifiziert. Signifikante Unterschiede mit * $p \leq 0,009$, tendenzielle Unterschiede mit # $p \leq 0,016$. Mann-Whitney Rank Sum Test mit Bonferroni-Korrektur. $n = 5$ (a, b), $n = 6$ (c,d)

3.9. Lokale pH-Wert Unterschiede im PDA

Neben dem Nährstoff- und Sauerstoffgradienten existiert im PDA ein relevanter pH-Gradient. Viele tumorspezifische Eigenschaften, wie beispielsweise anaerober Stoffwechsel und Laktatproduktion beeinflussen den pH-Wert des Gewebes. Der unterschiedliche pH-Wert im PDA wurde mit Hilfe der pH-Blotting Methode durchgeführt. In dieser wird im Wechsel ein Präparat in H/E gefärbt, während das nächste Präparat mittels pH-Blotting untersucht wird.

Anhand einer Übersichtsdarstellung eines typischen PDA Tumors in H/E lässt sich der makroskopische Aufbau des Tumors erkennen (Abb. 11a). Dieser besteht aus einem zentralen zystischen Hohlraum umgeben von Tumorgewebe. Mit Hilfe von pH-Blottings wurde die unmittelbar auf den H/E gefärbten Präparat folgende Schnitt dargestellt (Abb. 11b). Dabei konnte im nekrotischen Tumorrinneren ein wesentlich alkalischerer pH-Wert festgestellt werden. Der pH-Wert des perizentralen und peripheren Tumorgewebes stellte sich hingegen, verglichen mit dem durchschnittlichen pH-Wert der zentralen Nekrose, niedriger dar.

Diese Ergebnisse deckten sich mit den Ergebnissen der Untersuchung des Gewebe pH-Wertes mittels RapidLab Analyzer. Die Evaluation des pH-Werts, der aus dem Tumorrinneren entnommenen Zystenflüssigkeit, ergab einen signifikant höheren pH-Wert als der pH-Wert des aus dem Tumorrand gewonnenen Gewebes (Abb. 11c).

Anhand dieser Ergebnisse kann gezeigt werden, dass der pH-Wert im Tumorrinneren wesentlich höher ist, als der pH-Wert im Tumorrandbereich.

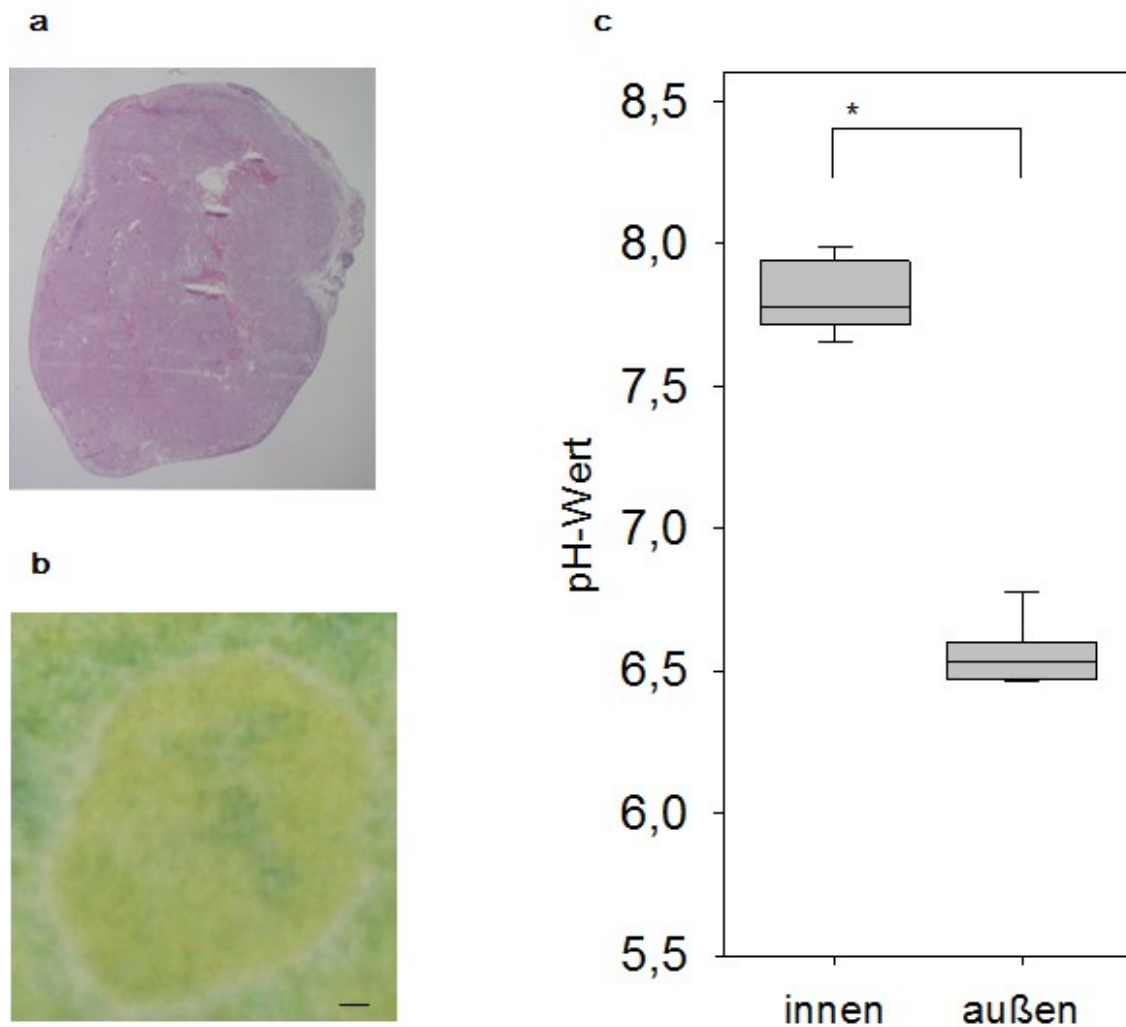


Abbildung 11: Lokale pH-Wert Unterschiede im PDA. Übersichtsdarstellung des PDA mittel H/E-Färbung (a) und pH-Blot (b) zur Darstellung des pH-Werts im PDA. Quantifizierung des pH-Werts am Tumorrand (außen) und im Tumorinneren (innen) mittels RapidLab Analyzer (c). Signifikante Unterschiede mit * $p = 0,002$. Mann-Whitney Rank Sum Test. $n = 6$. Balken = 100 μm

3.10. Beeinflussung der chemotherapeutischen Wirksamkeit durch den pH-Wert

Zur Untersuchung, ob der pH-Wert des Mediums Auswirkungen auf die Chemoresistenz der Karzinomzellen vermittelt, wurde zunächst der Einfluss des pH-Werts auf die Proliferation der Karzinomzellen und die Therapeutika vermittelte Hemmung in vitro mittels BrdU-ELISA analysiert. Durch anaeroben Stoffwechsel, welcher in Tumoren häufig stattfindet, entsteht Laktat, was zu einer Azidifizierung des Tumormikroenvironments führt. Aus diesem Grund sollte auch die Beeinflussung der

Wirksamkeit von Gemcitabin und Metformin durch dieses Glykolyseprodukt untersucht werden.

Deshalb erfolgte die Kultivierung der 6606PDA Zellen in dem Standardmedium ohne Beeinflussung des pH-Wertes. Es wurde bei einer Inkubation mit Gemcitabin und mit Gemcitabin und Metformin eine signifikant reduzierte Proliferation beobachtet. Dabei war ein leicht additiver Effekt durch die Kombination der beiden Therapeutika zu verzeichnen (Abb. 12a).

Anschließend erfolgte die entsprechende Untersuchung bei pH 7,8. Bei Inkubation mit 0,1 μ M Gemcitabin, 0,1 μ M Gemcitabin und 20 mM Metformin oder mit 20 mM Metformin wurde eine signifikant reduzierte Zellproliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet. Es konnte bei Kombination von Gemcitabin und Metformin ein tendenziell stärkerer Effekt verglichen mit dem Metformineffekt beobachtet werden (Abb. 12b).

Bei Zugabe von Laktat zum Normalmedium konnte kein abweichender Effekt der Therapeutika verglichen mit den Beobachtungen im Normalmedium erreicht werden. Sowohl die Gemcitabin als auch Gemcitabin- und Metforminkombinationsbehandlung führten zu einer signifikant reduzierten Zellproliferation (Abb. 12c).

Bei einem pH-Wert von 6,8 und der Zugabe von Laktat in das Medium wurde durch die Inkubation mit Gemcitabin, Gemcitabin und Metformin oder Metformin eine signifikant reduzierte Zellproliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe erreicht (Abb. 12d).

Demzufolge hatte der pH-Wert und der Laktatgehalt des Mediums in diesem in vitro Experiment nur einen geringen Einfluss auf die von Gemcitabin und Metformin vermittelte Hemmung der Zellproliferation.

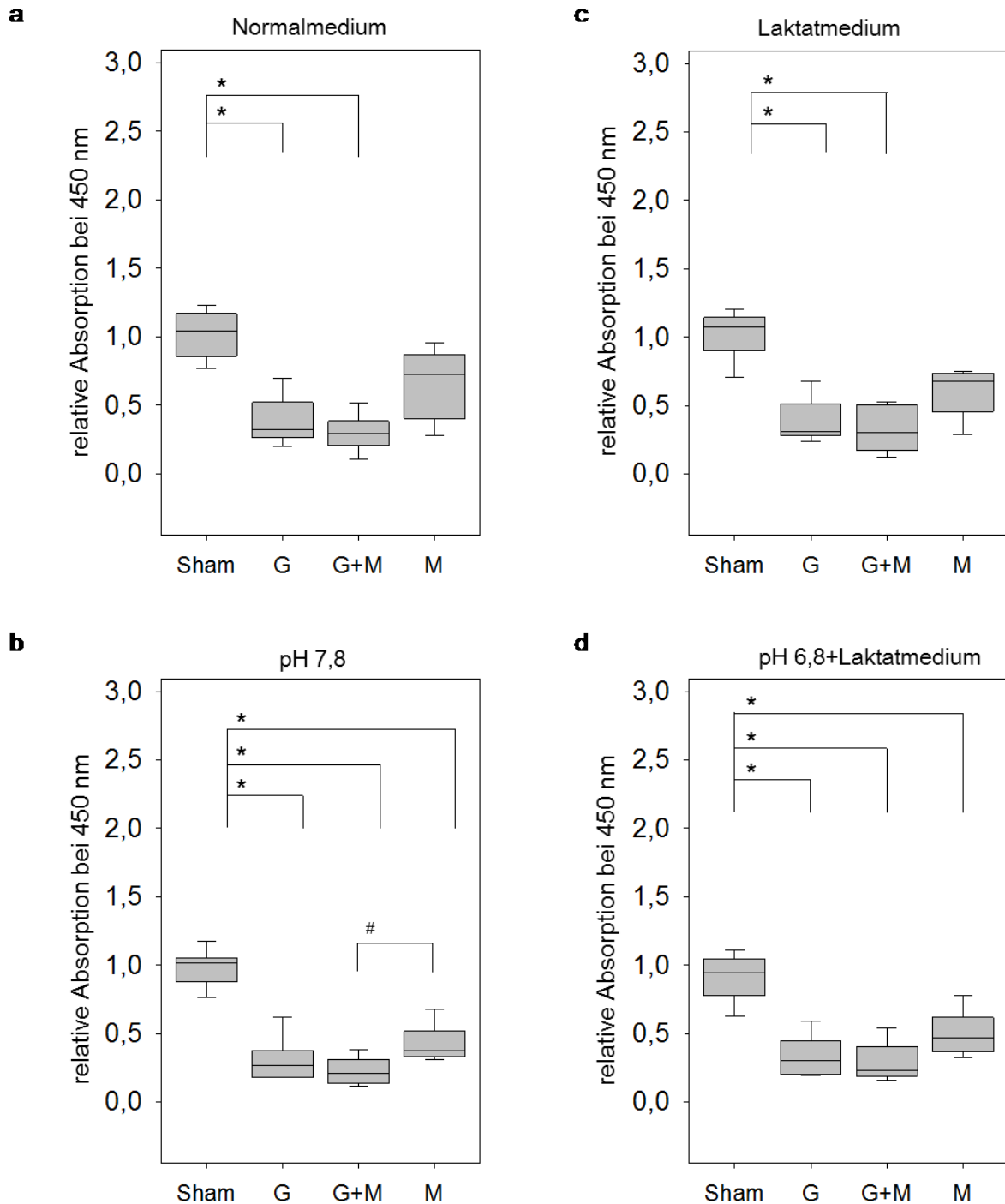


Abbildung 12: Beeinflussung der chemotherapeutischen Wirksamkeit durch den pH-Wert. Die Proliferation wurde mit Hilfe von BrdU-Assays evaluiert. Nach Behandlung mit PBS (Sham) Gemcitabin (G), Gemcitabin und Metformin (G+M) oder Metformin (M), bei Normalmedium (a), Medium mit pH 7,8 (b), Laktatmedium (c) und Laktatmedium mit pH 6,8 (d) verglichen. Signifikante Unterschiede mit * $p \leq 0,008$, tendenzielle Unterschiede mit # $= 0,015$. Mann-Whitney Rank Sum Test mit Bonferroni-Korrektur. $n = 5$ (a), $n = 8$ (b, c, d)

3.11. Einfluss des pH-Werts auf den Zelltod durch Therapeutika

Nachdem keine Beeinflussung der antiproliferativen Wirkung von Gemcitabin und Metformin durch den pH-Wert festgestellt werden konnte, wurde evaluiert, ob die zelltodinduzierende Wirkung der Therapeutika pH-Wert abhängig ist.

In der Kontrollgruppe (Sham) wurde kein relevanter Unterschied im Zelltod zwischen der Kultivierung in einem Medium mit vorherrschendem pH-Wert von 7,8 verglichen mit einem Medium mit pH-Wert von 6,8 und Laktat festgestellt (Abb. 13a).

Bei Inkubation mit 0,1 μ M Gemcitabin wurde ein signifikant niedrigerer Zelltod bei einem pH-Wert von 6,8 mit Laktat im Vergleich zur Inkubation in einem Medium mit einem pH-Wert von 7,8 beobachtet (Abb. 13b).

Auch bei Inkubation mit 0,1 μ M Gemcitabin in Kombination mit 20 mM Metformin wurde ein niedrigerer Zelltod bei Kultivierung in einem Medium mit einem pH-Wert 6,8 mit Laktat beobachtet (Abb. 13c).

Demgegenüber steht ein vermehrter Zelltod bei pH-Wert 6,8 und Laktat bei Inkubation mit 20 mM Metformin im Vergleich zur Kultivierung in einem Medium mit pH-Wert von 7,8 (Abb. 13d).

In diesem *in vitro* Modell konnte für Gemcitabin ein signifikant verstärkter, zelltodinduzierender Effekt bei pH-Wert 7,8 im Vergleich zu pH 6,8 festgestellt werden. Metformin hingegen zeigte eine stärkere zelltodinduzierende Wirkung bei pH 6,8 plus Laktat. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant.

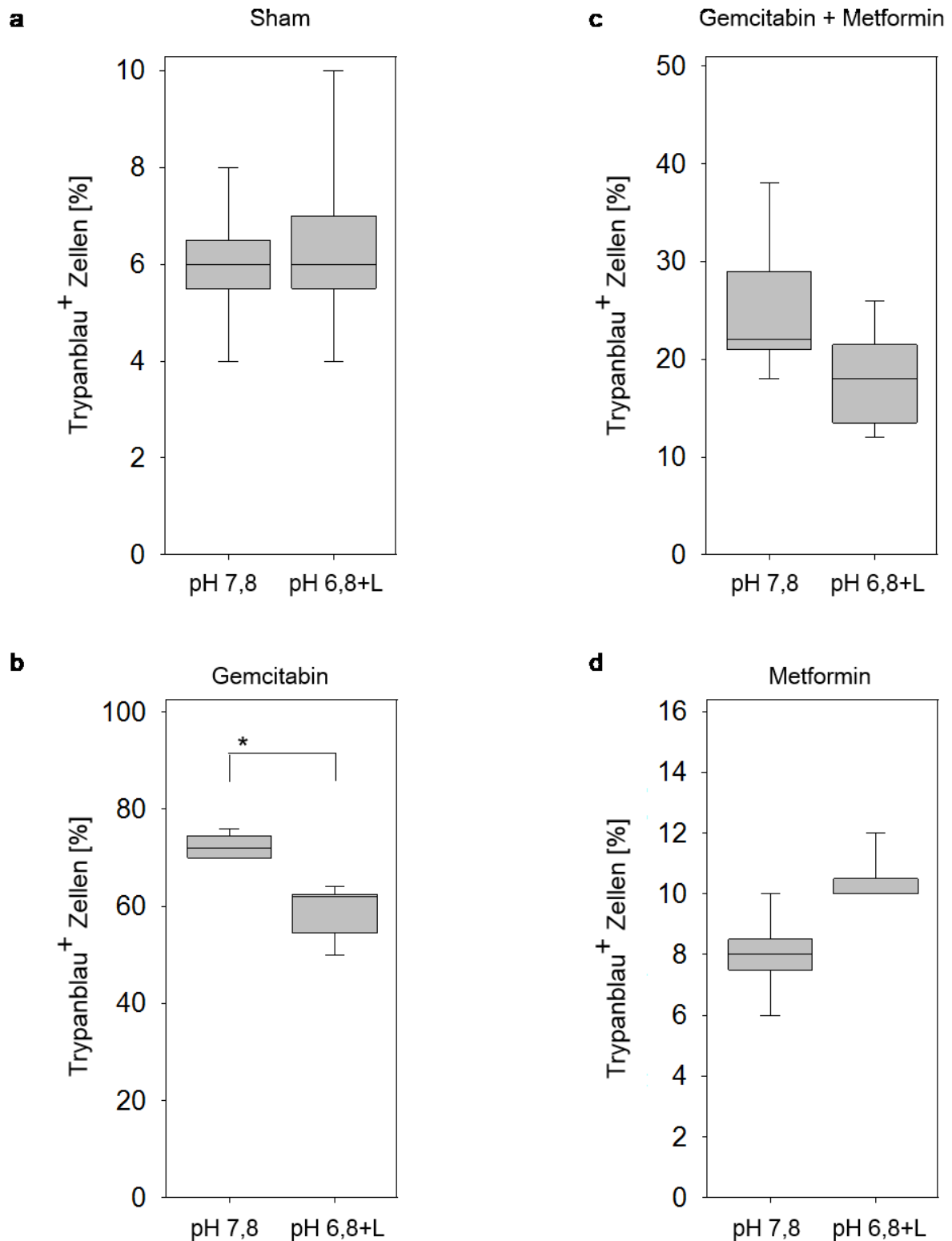


Abbildung 13: Einfluss des pH-Werts auf den Zelltod durch Therapeutika. Es wurde der Zelltod mittels Trypanblau-Assay ohne Therapeutika (Sham, a) oder mit Gemcitabin (b), Gemcitabin und Metformin (c) oder Metformin (d) bei pH 7,8 und pH 6,8+Laktat (L) im Medium verglichen. Signifikante Unterschiede mit * $p \leq 0,008$. Mann-Whitney Rank Sum Test. $n = 5$

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Methoden

4.1.1. Syngenes orthotopes Karzinommodell zur Untersuchung der Tumorheterogenität

Karzinommodelle spielen eine zentrale Rolle für das Verständnis molekularer Mechanismen des Pankreaskarzinoms sowie bei der Erprobung von Chemotherapeutika. Obwohl einige Therapeutika in Tiermodellen großen Erfolg gezeigt haben, konnten Patienten bisher kaum von diesen profitieren. Viele Untersucher sehen die Ursache der fehlenden Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse bei Patienten in einer zu geringen Widerspiegelung der Komplexität der menschlichen Erkrankung in Tiermodellen. Aus diesem Grund ist die genaue Kenntnis der Stärken, Schwächen und Übertragbarkeiten der geläufigen Tiermodelle unerlässlich [124].

Die derzeit wichtigsten Tiermodelle des PDAs lassen sich in Transplantationsmodelle, chemisch-induzierte sowie genetisch modifizierte Mausmodelle einteilen. Die Transplantationsmodelle werden weiter unterteilt in syngene und xenogene Transplantationsmodelle.

Chemisch-induzierte Karzinommodelle basieren auf der Verabreichung chemischer Substanzen, die über zelluläre Veränderungen in kurzer Zeit zu Pankreaskarzinomen führen. Eines der erprobtesten chemisch-induzierten Karzinommodelle ist das der N-nitrosobis (2-oxopropyl)-amine (BOP) induzierten Pankreastumore bei Syrischen Goldhamstern. In diesem Modell wird über intraperitoneale Injektion von BOP die Ausbildung von PDAs induziert [125, 126]. Das chemisch-induzierte Karzinommodell imitiert die spontanen Prozesse der Tumorgenese durch die Akkumulation von genetischen Mutationen. So kann die gesamte Spanne der Tumorentwicklung von präkanzerösen Läsionen bis zur Tumorentwicklung und Progression beobachtet werden. Allerdings beinhaltet dieses Modell auch einige Nachteile gegenüber dem von uns verwendeten syngenem orthotopen Karzinommodell. So induziert die Behandlung mit BOP nicht nur Veränderungen im Pankreas, sondern auch Neoplasien der Leber [127]. Des Weiteren ist in dem chemisch-induziertem Karzinommodell die Latenzzeit bis zum Auftreten der Karzinome mit durchschnittlich 13 bis 51 Wochen, abhängig von der Behandlungsfrequenz deutlich länger als in dem von uns verwendeten Modell [128].

Genetisch modifizierte Mausmodelle verwenden Gene, die in das Mausgenom durch Knock-in oder Knock-out inkorporiert werden [129]. Durch einen vorgeschalteten Promoter kann die Expression dieser Gene auf bestimmte Gewebe oder Zelllinien begrenzt werden. Typische Promotoren zur Steuerung der Entwicklung eines Karzinoms im Pankreas sind zum Beispiel Elastase, Mist1 oder Pdx1 [130].

Dieses Modell ist zur Analyse der Tumorheterogenität weniger geeignet, als das von uns verwendete syngene orthotope Transplantationsmodell, da die Latenz der Tumorentstehung sowie die Tumorprogression in diesen Modellen sehr variabel ist und die Kosten dieses Modells deutlich über denen des syngen orthotopen Pankreaskarzinommodells liegen [124].

Bei den Transplantationsmodellen werden xenogene von den syngen Transplantationsmodellen unterschieden. Außerdem wird anhand des Transplantationsortes orthotop, bei einer Implantation der Karzinomzellen im Pankreas der Maus von heterogenen, z.B. subkutanen Implantationen unterschieden [131].

Sowohl beim orthotopen als auch beim heterotopen xenogenen Transplantationsmodell werden humane Pankreaskarzinomzellen oder ganze Bruchstücke humaner Tumore in die Maus verpflanzt. Als humane Tumorzelllinien dienen dabei beispielsweise Panc-1 [132] oder MIA PaCa-2 Zellen [133]. Da es bei immunkompetenten Tieren bei einer Transplantation von humanen Karzinomzellen zu einer Abstoßungsreaktion kommt, müssen hierbei immunkompromittierte Trägartiere verwendet werden. Etabliert hat sich hierfür die severe combined immunodeficient (SCID) Maus, eine immunkompromittierte Maus, die auf Grund eines Gendefektes keine funktionsfähigen B- und T-Zellen bilden kann [118], oder die non-obese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID), die einen Verlust von B-, T-Zell und NK-Zellen aufweist [134, 135].

Während heterotope Transplantationsmodelle einfach durchzuführen und vergleichsweise kostengünstig sind, wird das pankreatische Mikromilieu als Einflussgröße auf das Tumorwachstum vernachlässigt. Aus diesem Grund unterscheiden sich die Tumore histopathologisch von den ursprünglichen PDAs, denn sie haben oft ein Defizit an Tumorstroma. Außerdem kommt es auf Grund einer fehlender Immunreaktion in xenogenen Modellen zu einem unrealistisch schnellen Tumorwachstum [136, 137]. In immunkompromittierten Mäusen entstehen somit

Tumore mit geringerer Komplexität und zellulärer Diversität, weshalb diese Modelle für die Untersuchung der Tumorerheterogenität weniger geeignet sind als das verwendete syngene orthotope Pankreaskarzinommodell.

Die orthotope Injektion von murinen Karzinomzellen ermöglicht die Entstehung von Pankreaskarzinomen ähnlicher Größe und Histologie im physiologischen Ursprungsgewebe eines immunkompetenten Wirtes. Bei der orthotopen Transplantation wird der Bauchraum des Versuchstiers eröffnet und es erfolgt eine Implantation innerhalb des Pankreas [138]. Dadurch sind orthotope Karzinommodelle technisch anspruchsvoller und führen zu einem größeren chirurgischen Trauma des Tieres. Diese orthotope Injektion ermöglicht die Interaktion der Karzinomzellen mit entsprechenden Organ-spezifischen Faktoren des Mikroenvironments wie dem Epidermalen Wachstumsfaktor, was zur Modulation des Tumorwachstums, der Tumorprogression und der Metastasierung beiträgt [139, 140]. So bilden beispielsweise eher orthotop, aber nicht heterotop implantierte Karzinomzellen metastatische Eigenschaften aus [141, 142]. Weiterhin bilden syngene orthotope Tumore eine klassische desmoplastische Reaktion aus und ähneln den humanen Tumoren auch in weiteren histologischen Aspekten, wie der Ausbildung von gangähnlichen Strukturen [138]. Die von uns asservierten Tumore zeigten zwar gangähnliche Strukturen, wuchsen jedoch eher verdrängend als infiltrativ. Die Tumore waren durch eine intensive desmoplastische Reaktion in der Tumorperipherie, welche ein typisches Merkmal humaner Karzinome darstellt [143], charakterisiert. Zwischen dem orthotopen und dem heterotopen Transplantationsmodell besteht eine große Diversität im Chemotherapieansprechen [140]. Aus diesem Grund sollten orthotope Modelle zur Untersuchung der Therapeutikawirksamkeit für eine bessere Vergleichbarkeit zu humanen Karzinomen bevorzugt werden. Damit ist das syngene orthotope Tumormodell gut geeignet, um sowohl die Therapiewirksamkeit als auch die Tumorerheterogenität des PDAs zu untersuchen.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Die Rolle der Wnt-Signaltransduktion in der Tumor-Stromainteraktion

Die Aktivität der Wnt-Signaltransduktion untersuchten wir mit Hilfe eines Wnt-Reportermausstammes, welcher unter Kontrolle des Axin2-Promoters β -Galaktosidase exprimiert. Dadurch konnte eine Aktivität des Wnt-Signalweges in einzelnen Zellen nachgewiesen werden, die eine ringförmige Formation am

Tumorrand des PDAs bildeten (Abb. 7c und 8b). Da die Aktivität der Wnt-Signaltransduktion sowohl bei $Axin2^{lacZ/lacZ}$ als auch bei $Axin2^{+/lacZ}$ nachgewiesen werden konnte, besaß Axin2 keinen Einfluss auf die Ausbildung dieser ringförmigen Zellformationen. Bei den einzelnen ringförmig angeordneten β -Galaktosidase positiven Zellen, handelt es sich vermutlich um immigrierende Zellen des Immunsystems. Neben (Tumor-assoziierten) Makrophagen bestehen diese infiltrierenden Zellen zu einem Großteil aus T-Zellen und stellen die natürliche Abwehrreaktion des Hosts gegen den Tumor dar [144]. Die Aktivität der Wnt-Signaltransduktion in der Differenzierung der T-Zellen ist bereits hinlänglich bekannt [145, 146], was diese Hypothese unterstützt.

In der Literatur wird die Funktion der Wnt-Signaltransduktion vorwiegend in Tumor-assoziierten Fibroblasten der Tumor-Stroma Interaktion diskutiert [147]. Eine Stimulation der Tumorprogression durch die TAFs über die Wnt-Signaltransduktion [148] wird ebenso wie eine Stimulation der TAFs durch die Karzinomzellen angenommen [149]. Unsere Ergebnisse hingegen zeigen keinen Hinweis auf diese wechselseitige Interaktion, denn wir konnten keine Aktivität der Wnt-Signaltransduktion in TAFs nachweisen.

Axin1 und Axin2 sind negative Regulatoren des Wnt-Signalweges, indem sie die Phosphorylierung und Ubiquitinierung von β -Catenin beschleunigen und damit die Translokation von β -Catenin in den Zellkern verhindern. Dadurch kontrolliert Axin die Zellproliferation [150]. Es ist eine negative Korrelation von Axin(1)-Genexpression und Tumorprogression im Plattenepithel des Ösophagus sowie im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom bekannt [150, 151]. Bei dem Vergleich des Tumorgewichts von $Axin2^{lacZ/lacZ}$ mit der Kontrollgruppe ($Axin2^{+/lacZ}$ und $Axin2^{+/+}$) konnte in unserem orthotopen Tiermodell kein wesentlicher Einfluss von Axin2 festgestellt werden. Dementsprechend zeigte die Genablation von Axin2 keine Beeinflussung des Tumorgewichts. Die Aktivierung des Wnt-Signaltransduktionsweges in den einzelnen ringförmig angeordneten β -Galaktosidase positiven Zellen, bei denen es sich vermutlich um Immunzellen handelt, trug damit nur unwesentlich zum Tumorgewicht bei.

4.2.2. Lokale Heterogenität im Karzinom

4.2.2.1. Zelltod

4.2.2.1.1. Nekrose

Typisches Charakteristikum vieler solider Tumore ist ein Gradient der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung, der durch insuffiziente Vaskularisation sowie durch unterschiedliche Distanzen zu den versorgenden Gefäßen bedingt ist [85, 100]. Die Gefäßversorgung der meisten Tumore erfolgt von peripher, weshalb die Perfusion der Tumorperipherie meist gesichert ist, während es zentral aufgrund eines Missverhältnisses von Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot zu einer Unterversorgung kommen kann. Dieses kann zur Ausbildung nekrotischer Areale im Tumor führen [100]. In Abbildung 14 ist die Verteilung der Gradienten, die auf Grundlage dieses Versorgungsmusters entstehen, schematisch dargestellt.

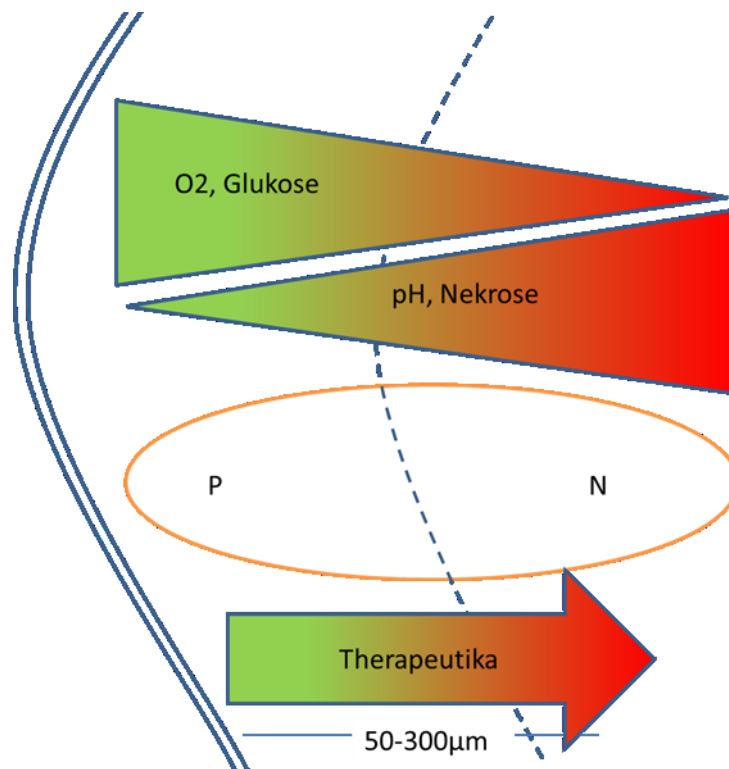


Abbildung 14: Gradienten innerhalb solider Tumore. Glukose und O₂: von peripher nach zentral sinkender Gradient; pH-Wert und Nekrose: von peripher nach zentral steigender Gradient. Innerhalb von 50-300 µm Abstand vom Tumorrand existieren unterschiedliche Zonen, in denen jeweils Proliferation (P) und Zelltod (N) vorherrscht. Therapeutika diffundieren von peripher nach zentral. Modifiziert nach Sutherland 1988 [100].

Aus diesem Grund befindet sich im Inneren des Tumors ein größerer Prozentsatz nekrotischer Areale verglichen mit dem Tumorrand. Auch in unserem orthotopen

Tumormodell beobachteten wir einen signifikant ($p = 0,021$) größeren Prozentsatz nekrotischer Areale im Tumorinneren (6,0/4,0-8,3; Median/ Interquartilsabstand) verglichen mit dem Tumorrand (3,2/2,5-4,7; Median/ Interquartilsabstand). Obwohl für Gemcitabin ein Zelltod-induzierender Effekt auf pankreatische Karzinomzellen bekannt ist [152], konnten wir diesen in unserem in vivo Modell nicht beobachten (Abb. 4). Durch eine Behandlung mit Gemcitabin konnte weder am Tumorrandbereich noch im Tumorinneren eine signifikante Zunahme der nekrotischen Flächen erreicht werden. Mögliche Ursache der fehlenden Steigerung des Zelltods durch Gemcitabin in vivo könnte eine unzureichende Anreicherung des Therapeutikums innerhalb des Tumors sein. Hessmann et al. konnten kürzlich zeigen, dass Pankreatische Sternzellen und TAFs hohe Gemcitabinkonzentrationen intrazellulär aufnehmen und einschließen. Nach Metabolisierung stehen den Karzinomzellen dadurch weniger aktive Gemcitabin-Metaboliten zur Verfügung [153]. Dieser Effekt könnte die herabgesetzte anti-Tumor Wirkung Gemcitabins in Tumoren mit ausgeprägter desmoplastischer Reaktion erklären. Allerdings erklärt diese Hypothese nicht die unten beschriebenen Beobachtungen der verstärkten antiproliferativen Wirkung Gemcitabins im Tumorinneren.

Am Tumorrand führte die Metformin-Monotherapie zu einem signifikant erhöhten Anteil nekrotischer Areale an der Gesamtfläche im Vergleich zur Kombinationsbehandlung von Gemcitabin und Metformin. Gemcitabin reduzierte somit die zelltodinduzierende Wirkung Metformins am Tumorrand (Abb. 4). Metformin induziert den Zelltod vermutlich über eine Modifikation des Energiemetabolismus der Karzinomzellen. Durch Hemmung des mitochondrialen Komplex I der Atmungskette hemmt Metformin die oxidative Phosphorylierung [53, 154] und reduziert die ATP-Konzentration in Karzinomzellen. Die reduzierte ATP-Konzentration könnte bei Tumorzellen, die naturgemäß einen hohen Energiebedarf haben, Zelltod induzieren. Gemcitabin führt durch die Inkorporation seiner aktiven Metabolite in die neu synthetisierte DNA der Karzinomzellen zu einer Hemmung der Proliferation [155]. Aus diesem Grund sind in den Karzinomzellen unter Gemcitabintherapie weniger ATP-verbrauchende Vorgänge aktiv und die Karzinomzellen könnten bei einer niedrigeren ATP-Konzentration leichter überleben. So könnte Gemcitabin den durch die Metforminbehandlung verursachten Zelltod hemmen.

4.2.2.1.2. Apoptose

Eine weitere Form des Zelltods ist die Apoptose, welche von der betroffenen Zelle selbst ausgelöst und aktiv durchgeführt wird. In unserem orthotopen Tiermodell des PDAs konnten wir im Tumorinneren (10,3/8,7-15,6; Median/ Interquartilsabstand in Apoptag⁺-Zellen/Gesichtsfeld) einen signifikant ($p < 0,001$) größeren Prozentsatz apoptotischer Zellen verglichen mit dem Tumorrandbereich (4,7/3,7-5,7; Median/ Interquartilsabstand in Apoptag⁺-Zellen/Gesichtsfeld) feststellen (Abb. 5). Die Eigenschaften des Tumorinneren mit reduzierter Perfusion, Hypoxie (Abb. 14) und erhöhtem interstitiellen Flüssigkeitsdrucks scheinen somit einen verstärkten Zelltod, sowohl durch Nekrose, als auch durch Apoptose zu bedingen.

Obwohl für Gemcitabin bekannt ist, dass es seine anti-tumor Wirkung u.a. über die Induktion der Apoptose vermittelt [44], konnten unsere Ergebnisse diese Wirkungsweise nicht unterstützen. Wir konnten keine signifikant vermehrte Apoptoseinduktion nach Gemcitabintherapie in der histologischen Auswertung mit Hilfe einer Apoptag Histochemie feststellen (Abb. 5). Man könnte vermuten, dass die Pankreaskarzinomzellen Fähigkeiten besitzen, um der Gemcitabin vermittelten Apoptose zu entgehen [156, 157]. Ein klassisches Beispiel hierfür ist der Verlust der TP53 Tumor Suppressor-Funktion oder die verstärkte Expression von anti-apoptotischen Genen wie Bcl-2 und Bcl-xL [143]. Diese Mechanismen tragen zur primären oder erworbenen Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bei, die einen anti-Tumor-Effekt über eine Induktion von Apoptose vermitteln [158]. Auch für Metformin ist eine Apoptose induzierende Wirkung auf Pankreaskarzinomzellen bekannt [159]. Allerdings konnten wir durch Metformin ebenfalls keine signifikante Apoptoseinduktion im Tumorinneren und -randbereich feststellen (Abb. 5).

4.2.2.2. Proliferation

Basierend auf den lokal unterschiedlichen Bedingungen des Mikroenvironments in soliden Tumoren existiert neben einer Heterogenität im Zelltod eine Heterogenität der Tumorzellproliferation [100]. Dabei ermöglichen die Bedingungen am Tumorrand normalerweise eine größere Tumorzellproliferationsrate im Vergleich zum Tumorinneren [100]. Diese These wird auch durch Erkenntnisse aus in vitro Untersuchungen des dreidimensionalen multizellulären Sphäroidmodells unterstützt. In diesem Modell weisen die Zellen eine unterschiedliche Viabilität auf. Es existiert eine zonale Schichtung aus proliferierenden Zellen, die nekrotische Zellen im

Tumorinneren umgeben. Diese zonale Schichtung wird durch die Versorgung von peripher begründet [100].

In den Tumoren dieses Tiermodells konnten wir keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,234$) der Zellproliferation in der Kontrollgruppe zwischen Tumorinneren und Tumorrandbereich feststellen (Abb. 3a-d; Tumorinneres: 16,3/13,5-19,7; Tumorrand: 15,0/12,7-16,6; Median/Interquartilsabstand in BrdU⁺-Zellen/Gesichtsfeld).

Demgegenüber variierte die antiproliferative Wirkung des Chemotherapeutikums Gemcitabin in Abhängigkeit von der Entfernung zum Tumorrand. Gemcitabin hemmte die Tumorzellproliferation im Tumorinneren deutlich stärker als im Tumorrandbereich, wobei dieser Unterschied nicht signifikant ($p = 0,209$) war (Tumorinneres: 37,4/-3,6-45,8; Tumorrand: 3,4/-16,0-34,4; Median/Interquartilsabstand in % Hemmung; Abb. 3a-d). Diese Ergebnisse lassen sich nicht auf die klassischen, als Barrierschicht für Chemotherapeutika verstandenen Effekte der desmoplastischen Reaktion zurückführen, da man sonst eine noch geringere Wirkungsweise im Tumorinneren erwarten müsste [96, 97]. Möglicherweise ist die geringere Sensibilität der Karzinomzellen gegenüber Gemcitabin im Tumorrandbereich auf die wechselseitige Interaktion der Karzinomzellen mit Bestandteilen des Tumorstromas zurückzuführen. Die Ausbildung einer desmoplastischen Reaktion ist charakteristisch für das PDA. Diese wird insbesondere von Tumor-assoziierten Fibroblasten (aktivierte Pankreatische Sternzellen) gebildet, welche Proteine der EZM sezernieren und mit den Karzinomzellen in wechselseitiger Interaktion stehen [92, 93]. Bereits 1999 konnten die tumorfördernden Eigenschaften von tumor-assoziierten Fibroblasten im Vergleich zu einfachen Fibroblasten nachgewiesen werden. Nur die TAFs stimulierten das Tumorstromawachstum [160]. Es konnte gezeigt werden, dass die TAFs das Tumorstromawachstum parakrin durch die Sekretion des Stromal cell-derived factor-1 (SDF1) und die Stimulation des CXCR4 Rezeptor unterstützen [161]. Diese tumorprogressionsfördernde Eigenschaft der TAFs ist auch speziell für das PDA beschrieben worden [94]. Ferner konnten Hwang et al. in ihrer Studie sogar eine Sternzell-vermittelte reduzierte Empfindlichkeit der Pankreastumorzellreaktion auf Gemcitabintherapie oder Bestrahlung feststellen [94]. Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe unterstützen diese These. Denn durch Kultivierung der 6606PDA Zellen mit Pankreatischen Sternzellen konnte eine signifikant schwächere Hemmung der Zellproliferation durch Gemcitabin beobachtet werden [162].

Anders als Gemcitabin hemmte Metformin die Proliferation vorwiegend im Tumorrandbereich während Metformin im Tumorrinneren kaum zur Reduktion der Zellproliferation beitrug (Abb. 3 a-d). Es wird vermutet, dass Metformin anti-tumor Eigenschaften über den AMPK/mTOR Signalweg vermittelt, und dabei den Energiemetabolismus und die Proteinbiosynthese der Karzinomzellen beeinflusst [163]. In in vitro Experimenten konnte gezeigt werden, dass Metformin AMPK/mTOR vermittelt zu einer Hemmung von Brustkrebszellproliferation führt [164]. Auch in in vivo Experimenten konnte eine metforminabhängige Hemmung der Tumorprogression durch Metformin festgestellt werden [165]. Dass unsere Ergebnisse eine reduzierte Tumorzellproliferation durch Metformintherapie am Tumorrandbereich demonstrieren, während im Tumorrinneren nur eine geringfügig reduzierte Zellproliferation beobachtet werden kann, könnte auf eine Beeinflussung der antiproliferativen Wirksamkeit des Therapeutikums durch die charakteristischen Eigenschaften des Tumormikroenvironments im Tumorrinneren wie Hypoglykämie, Hypoxie und alkalischen pH-Wert zurückzuführen sein.

4.2.3. Mögliche Ursachen für die lokale Heterogenität des Therapieansprechens

4.2.3.1. Beeinflussung der antiproliferativen Wirkung von Gemcitabin und Metformin durch die Glukosekonzentration

Innerhalb solider Tumore existiert eine Dysbalance an schlechter Glukoseversorgung und außergewöhnlich hohem Glukoseverbrauch. Aus diesem Grund ist Glukosemangel eine charakteristische Eigenschaft innerhalb solider Tumore [100]. Allerdings ist bekannt, dass Karzinomzellen zur Aufrechterhaltung ihrer hohen Proliferationsrate eine Versorgung mit ausreichend Glukose benötigen [166].

In vitro simulierten wir diese Bedingungen, indem wir 6606PDA Zellen sowohl bei niedriger Glukosekonzentration (0,5 g/l Glukose) als auch bei hoher Glukosekonzentration (4,5 g/l Glukose) kultivierten. Beim Vergleich der absoluten Absorption im BrdU-ELISA konnte meine Arbeitsgruppe eine signifikant reduzierte ($p = 0,006$) Proliferation bei Kultivierung mit 0,5 g/l Glukose im Vergleich zu 4,5 g/l Glukose zeigen [162]. Auch für andere Pankreaskarzinomzelllinien ist ein fördernder Effekt von hohen Glukosekonzentrationen auf Zellproliferation und die Tumorprogression bekannt [167, 168].

Die Gemcitabin-vermittelte Hemmung der Zellproliferation wurde nicht signifikant ($p = 1,0$) durch die Glukosekonzentration des Mediums beeinflusst (hohe

Glukosekonzentration: 39,4/33,4-50,6; niedrige Glukosekonzentration: 42,5/33,2-50,2; Median/ Interquartilsabstand in % Hemmung; siehe auch Abb. 9a und b). Metformin hemmte die Zellproliferation bei niedriger Glukosekonzentration signifikant ($p < 0,001$) stärker als bei hoher Glukosekonzentration (hohe Glukosekonzentration: 14,8/2,3-31,1; niedrige Glukosekonzentration: 56,4/47,6-75,7; Median/ Interquartilsabstand in % Hemmung; siehe auch Abb. 9a und b). Zu diesem Ergebnis ist auch die Arbeitsgruppe von Zhuang et al. gekommen, die einen zytotoxischen Effekt von Metformin auf Mamma- und Ovarialkrebszelllinien bei niedrigen Glukosekonzentrationen festgestellt haben, welche unter normalen Glukosekonzentrationen jedoch resistent gegenüber Metformin waren [169]. Sinnott-Smith et al. konnten in Zellkulturuntersuchungen an Pankreaskarzinomzellen zeigen, dass die Metformin-abhängige Aktivierung der AMPK bei einer Glukosekonzentration von 5 mM (0,9 g/l) verstärkt war [170].

Die stärkere antiproliferative Wirkung Metformins bei niedriger Glukosekonzentration (Abb. 9 a-d) widerspricht den in vivo Ergebnissen mit einer stärkeren antiproliferativen Wirkung von Metformin am Tumorrand (Abb. 3 a-d), da wir am Tumorrand eine höhere Glukosekonzentration als im Tumorrinneren erwarten (Abb. 14). Demnach ist die größere antiproliferative Wirkung Metformins am Tumorrand vermutlich nicht auf die Beeinflussung durch die Glukosekonzentration zurückzuführen.

4.2.3.2. Beeinflussung der antiproliferativen Wirkung von Gemcitabin und Metformin durch die Sauerstoffkonzentration

Das PDA ist durch das Vorhandensein transienter und permanenter intratumoraler Hypoxie charakterisiert [171]. Intratumorale Hypoxie steigert unter anderem durch Stimulation der Tumorprogression und Invasivität die Tumoraggressivität [172].

Wir konnten in unseren in vitro Untersuchungen allerdings keine signifikante ($p = 0,222$) Beeinflussung der Proliferation der 6606PDA Zellen durch Sauerstoffkonzentration feststellen (Abb. 10 a und b). Die Proliferation der 6606PDA Zellen, gemessen in absoluter Absorption bei 450 nm mittels BdrU-ELISA, war unter Hypoxie moderat erhöht (Normoxie: 0,9/0,9-1,2; Hypoxie: 1,1/1,0-1,4; Median/ Interquartilsabstand in absoluter Absorption bei 450 nm). Die antiproliferative Wirkung von Gemcitabin ($p = 0,548$) und Metformin ($p = 0,548$) wurde durch die Sauerstoffkonzentration nicht signifikant beeinflusst (Gemcitabin Normoxie: 98,4/95,3-

98,9; Hypoxie: 98,5/95,8-99,7; Metformin Normoxie: 48,8/33,9-66,6; Hypoxie: 41,3/31,3-60,7; Median/ Interquartilsabstand in % Hemmung).

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den von Yokoi et al. publizierten Ergebnissen, welche eine Resistenz der Pankreaskarzinomzellen gegenüber Gemcitabin durch Hypoxie beschreiben [101].

Eine Ursache der nur moderaten Beeinflussung der Zellproliferation und der nicht relevanten Beeinflussung der Therapeutikawirksamkeit durch die Sauerstoffkonzentration könnte in den Versuchsbedingungen zu finden sein. Die Inkubation der 6606PDA Zellen unter hypoxischen Bedingungen bei 1 % Sauerstoff für 72 Stunden könnte einen zu schwachen Stimulationsreiz darstellen und die Proliferation der Karzinomzellen dadurch nicht wesentlich beeinflussen. Möglicherweise induziert eine Hypoxie von 1 % Sauerstoff keine zellulären Veränderungen, wohingegen eine stärkere Hypoxie von 0,01 % eine Aktivierung relevanter Signalkaskaden auslöst [173]. Unter Umständen hätte diese Kulturbedingung auch in unserem Modell zu relevanten Ergebnissen führen können.

4.2.3.3. Beeinflussung der antiproliferativen Wirkung von Gemcitabin und Metformin durch den pH-Wert und die Laktatkonzentration

Der 1956 von Otto Warburg eingeführte „Warburg Effekt“ oder „oxidative Glykolyse“ beschreibt die Besonderheit von Karzinomzellen auch in Anwesenheit von Sauerstoff die Metabolisierung von Glukose zu Laktat durchzuführen [174]. Aus diesem Grund wird vermutet, dass die oxidative Glykolyse in Tumoren mehr als ein Anpassungsmechanismus der Karzinomzellen darstellt, sondern durch die Produktion von Laktat zur Schaffung eines aggressiven Tumormikroenvironments beiträgt, welche den Karzinomzellen Vorteile gegenüber somatischen Zellen bietet [175]. Der Großteil von Laktat und H^+ -Ionen wird in den extrazellulären Raum transportiert. Der intrazelluläre pH-Wert der Karzinomzellen bleibt somit neutral bis alkalisch, während das extrazelluläre Milieu einen sauren pH-Wert erreicht. Dieser saure extrazelluläre pH-Wert kann innerhalb solider Tumore aufgrund der insuffizienten Perfusion nicht ausgeglichen werden, da die „Säuren“ nicht über die Tumorgefäße entfernt werden [176].

Auch unsere Ergebnisse zeigten einen überwiegend sauren pH-Wert innerhalb vitaler Regionen des PDA, aber einen alkalischen pH-Wert im Tumorinneren, in der Nähe der zentral gelegenen Zyste (Abb. 11c). Der zystische Hohlraum im Inneren des Tumors

ist vermutlich auf einen nekrotischen Untergang von Karzinomzellen auf Grund von Hypoxie, Nährstoffunterversorgung und einer Akkumulation toxischer Abbauprodukte zurückzuführen. Dabei blähen sich nekrotische Zellen auf, explodieren und setzen ihre Inhaltsstoffe in die Umgebung frei [143]. Auf Grundlage eines intrazellulären alkalischen pH-Werts [176] könnte die Freisetzung der intrazellulären Bestandteile zu einer Anhebung des pH-Werts innerhalb des nekrotisch umgewandelten zystischen Hohlraumes führen.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse untersuchten wir, ob der pH- und Laktatwert einen Einfluss auf die Tumorzellproliferation und die antiproliferative Wirksamkeit von Gemcitabin und Metformin besitzt.

Die Veränderung des pH-Werts und das gleichzeitige Hinzufügen von Laktat in das Kulturmedium hatte keinen signifikanten ($p = 0,354$) Einfluss auf die Zellproliferation der 6606PDA Zellen (Normalmedium: 1,0/0,83-1,2; pH 6,8 plus Laktat: 0,9/0,7-1,1; Median/ Interquartilsabstand in absoluter Absorption bei 450 nm). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu Beobachtungen aus in vitro Studien, in welchen andere Tumorzelllinien bei einem extrazellulären pH-Wert von 6,8 eine höhere Proliferationsrate, aber „normale“ Zellen eine höhere Proliferation bei einem pH 7,3 aufwiesen [176]. Laktatazidose induziert in Karzinomzellen die Umstellung der anaeroben Glykolyse zu Gunsten der oxidativen Phosphorylierung [177] und könnte dadurch eine Steigerung der Tumorzellproliferation durch eine Erhöhung des vorhandenen ATPs begünstigen.

Die antiproliferative Wirkung Gemcitabins wurde durch einen niedrigen pH-Wert plus Laktat nicht signifikant ($p = 0,530$) beeinträchtigt (Normalmedium: 67,8/51,5-71,3; pH 6,8 plus Laktat: 61,6/53,9-65,6; Median/ Interquartilsabstand in % Hemmung). Auch die Hemmung der Zellproliferation durch Metformin wurde durch den pH-Wert plus Laktat nicht signifikant ($p = 0,876$) beeinflusst (Normalmedium: 36,9/19,7-56,9; pH 6,8 plus Laktat: 47,4/28,1-53,8 Median/ Interquartilsabstand in % Hemmung).

Demnach können wir die heterogene antiproliferative Wirksamkeit von Gemcitabin und Metformin in vivo (Abb. 3) nicht auf einen erniedrigten pH-Wert bei gleichzeitig erhöhter Laktatkonzentration zurückführen.

4.2.4. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der Untersuchung der Zellproliferation erbrachten eine räumliche Heterogenität in der antiproliferativen Wirkung von Gemcitabin und Metformin (Abb. 3c und d). Die stärkere Hemmung der Zellproliferation im Tumorrinneren durch Gemcitabin konnten wir nicht auf die Beeinflussung der antiproliferativen Wirksamkeit durch die Glukosekonzentration in vitro erklären.

Auch die antiproliferative Wirkung Metformins konnten wir nicht durch die in vitro Ergebnisse erklären. Während Metformin am Tumorrandbereich die Zellproliferation stärker hemmte (Abb. 3d), war der antiproliferative Effekt Metformins in vitro unter niedriger anstatt unter hoher Glukosekonzentration verstärkt (Abb. 9a und b).

Die von uns beobachteten räumlich unterschiedlichen antiproliferativen Effekte von Gemcitabin und Metformin konnten wir weder mit Hilfe der Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses von Hypoxie (Abb. 10a und b) noch durch die Ergebnisse der Untersuchung des pH- und Laktatwertes (Abb. 12a-d) in vitro hinreichend erklären. Demnach lässt sich die räumlich unterschiedliche antiproliferative Wirkung der beiden Therapeutika nicht allein auf die unterschiedliche Versorgung der Karzinomzellen mit Sauerstoff und den unterschiedlichen pH-Wert und Laktatgehalt zurückführen.

Die fehlende Reproduzierbarkeit der in vivo Ergebnisse unter in vitro Bedingungen könnte auf die insuffiziente Abbildung der in vivo Bedingungen in der Zellkultur liegen. Vermutlich spiegelt die Imitation einer charakteristischen Eigenschaft des Tumormikroenvironments in vitro nur einen kleinen Aspekt der natürlichen Bedingungen im PDA wider, sodass die in vitro Ergebnisse nicht mit den in vivo Ergebnissen vergleichbar sind. Die Kultivierung einer einzigen Karzinomzellpopulation und damit eines einzigen Zellklons in vitro stellt eine Vernachlässigung aller weiteren Zelltypen des Tumorstromas und ihres Einflusses auf die Karzinomzellen dar. Denn den zellulären Bestandteilen des Tumorstromas wird eine stimulierende Einflussnahme auf die Karzinomzellen und die Wirksamkeit von Therapeutika zugeschrieben [74, 178]. Auch Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die Kultivierung der 6606PDA Zellen mit Pankreatischen Sternzellen zu einer signifikant schwächeren Hemmung der Zellproliferation durch Gemcitabin führt [162]. Daher ist es unsere Hypothese, dass die heterogene Wirksamkeit der Therapeutika Gemcitabin und Metformin in vivo durch das Zusammenwirken multipler Faktoren des Tumormikroenvironments verursacht wird.

4.2.5. Relevanz der Ergebnisse

Das PDA ist ein Tumor, dessen Prognose sich in den letzten Jahrzehnten trotz intensiver Erforschung kaum verbessert hat. Es wird erwartet, dass das PDA bis 2030 die zweithäufigste Krebstodesursache in den USA darstellen wird [11]. Diese schlechte Prognose ist unter anderem auf die schlechte Wirksamkeit der bislang verfügbaren Chemotherapeutika zurückzuführen. Das derzeit verwendete Standardtherapeutikum Gemcitabin verlängert das postoperative Überleben nur um wenige Monate [24]. Deshalb ist das Verständnis der Wirkungsweise der verwendeten Therapeutika im PDA und die Untersuchung der Mechanismen, mit denen sich das PDA einer suffizienten Therapie entzieht, besonders wichtig, um verbesserte Therapieansätze zu entwickeln.

Die Tumorerheterogenität in soliden malignen Tumoren wird inzwischen als ein möglicher Grund für ein Therapieversagen angesehen [179]. Auch der Einfluss des Tumorstromas auf die Progression und das Therapieansprechen des PDAs hat inzwischen einen großen Stellenwert in der Erforschung dieser Tumorentität erlangt [74, 92, 96]. Durch das Verständnis der wechselseitigen Beeinflussung von Karzinomzellen und Bestandteilen des Tumorstromas könnten Therapeutika entwickelt werden, die diese Interaktionen unterbinden.

Die in dieser Studie präsentierten Daten belegen, dass eine intratumorale Heterogenität in Bezug auf die Zelltod-induzierenden und antiproliferativen Eigenschaften von Gemcitabin und Metformin im PDA besteht. Die beiden Therapeutika erwiesen sich in unseren Untersuchungen größtenteils als sinnvolle Kombinationspartner, da sie einen anti-tumor Effekt in unterschiedlichen Regionen des PDAs vermitteln.

4.2.6. Ausblick

Das zunehmende Verständnis der Tumorerheterogenität ermöglicht die Entwicklung von Chemotherapeutika, die nicht nur die Karzinomzellen sondern auch Bestandteile des Tumorstromas angreifen. Denn durch intensive Erforschung des Tumorstromas ist die Identifizierung der wechselseitigen Beeinflussung von Karzinomzellen und Tumorstroma möglich. Inzwischen ist bekannt, dass das Tumorstroma maßgeblich zur Therapieresistenz des PDAs beiträgt [96]. Pankreatische Sternzellen und TAFs besitzen zum Beispiel Mechanismen, die durch Gemcitabinmetabolisierung zu einer reduzierten Therapeutikaanreicherung in den Karzinomzellen führt [153]. Aus diesem

Grund wäre eine Verbesserung der Anreicherung von Chemotherapeutika über eine Modifikation des Tumormikroenvironments erstrebenswert.

Eine verbesserte Chemotherapeutikaaanreicherung könnte auch über die Ausnutzung des Tumormikroenvironments möglich sein. Dabei könnten Chemotherapeutika verwendet werden, die gezielt eine Anreicherung im Tumor unter Ausnutzung der spezifischen Charakteristika des Tumors wie Azidität ausnutzen.

Weiterhin sollten die derzeit verwendeten präklinischen Modelle der Erforschung des duktaalen pankreatischen Adenokarzinoms weiter entwickelt werden. Ich denke, dass die derzeit verwendeten in vitro Modelle die in vivo Situation nur insuffizient widerspiegeln. So konnten bereits Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die Kultivierung von pankreatischen Karzinomzellen mit pankreatischen Sternzellen in vitro zu einer signifikant schwächeren Hemmung der Zellproliferation durch Gemcitabin führt. Damit konnten in diesem in vitro Modell Ergebnisse produziert werden, die die in vivo Ergebnisse besser erklären, als die Ergebnisse, die bei alleiniger Kultivierung von 6606PDA Zellen gewonnen wurden. Für ein besseres Verständnis der Wirkungsweise von Therapeutika im Tumor und für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte wäre die Einführung weiterer in vitro Modelle, die das Tumormikroenvironment besser widerspiegeln, erfolgversprechend. Ein Beispiel für ein in vitro Modell, welches die Tumorheterogenität des PDAs gut widerspiegelt, ist ein kürzlich von Brancato et al. veröffentlichtes 3D Mikrogewebe-Modell des PDAs. Durch Ko-Kultivierung von PDA Karzinomzellen zusammen mit TAFs in Mikroträgern konnte in diesem Modell die Ausbildung der charakteristischen desmoplastischen Reaktion erreicht werden. Auch in weiteren Aspekten ähnelte das Mikrogewebe dem PDA. Somit könnte es zukünftig ein in vitro Modell zur Untersuchung der Tumor-Stroma Interaktion darstellen [180].

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsnummer	Beschriftung
Abbildung 1	Selektive Resistenz spezieller klonaler Varianten gegenüber Chemotherapeutikum
Abbildung 2	Behandlungsplan „Untersuchung der Wnt-Signaltransduktion im PDA“
Abbildung 3	Hemmung der Zellproliferation
Abbildung 4	Geringer Einfluss der Therapien auf Nekrose
Abbildung 5	Geringer Einfluss der Therapien auf Apoptose
Abbildung 6	Minimaler Einfluss von Therapeutika, Inflammation und Diabetes auf die desmoplastische Reaktion
Abbildung 7	Evaluation der Aktivität des Wnt-Signaltransduktionsweges
Abbildung 8	Analyse der Genablation von Axin2
Abbildung 9	Einfluss der Glukosekonzentration auf die Wirksamkeit von Therapeutika
Abbildung 10	Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Wirksamkeit von Therapeutika
Abbildung 11	Lokale pH-Wert Unterschiede im PDA
Abbildung 12	Beeinflussung der chemotherapeutischen Wirksamkeit durch den pH-Wert
Abbildung 13	Einfluss des pH-Werts auf den Zelltod durch Therapeutika
Abbildung 14	Gradienten innerhalb solider Tumore

Tabellennummer	Beschriftung
Tabelle 1	Abweichende Kulturbedingungen in den einzelnen Versuchen
Tabelle 2	Trypan Blau: Inkubationszeit Therapeutika in den einzelnen Versuchen
Tabelle 3	BrdU: Inkubationszeit Therapeutika in den einzelnen Versuchen
Tabelle 4	Verwendete Primär- und Sekundärantikörper
Tabelle 5	Aktivität der Wnt-Signaltransduktion bei Tumoren in Axin2 ^{+/lacZ} -Mäusen
Tabelle 6	Aktivität der Wnt-Signaltransduktion bei Tumoren in Axin2 ^{2+/lacZ} - und Axin2 ^{lacZ/lacZ} -Mäusen zum späten Zeitpunkt

Literaturverzeichnis

1. Schiebeler TH, Korf H-W. Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs ; mit 111 Tabellen. 10th ed. Darmstadt: Steinkopff; 2007.
2. Aumüller G, Wurzingler LJ. Anatomie: 208 Tabellen. 2nd ed. Stuttgart: Thieme; 2010.
3. Siewert JR, Stein HJ, editors. Chirurgie: Mit integriertem Fallquiz. 9th ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2012.
4. Zilles K, Tillmann BN. Anatomie. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010.
5. Bledsoe, JR, Shinagare SA, Deshpande V. Difficult Diagnostic Problems in Pancreatobiliary Neoplasia. Arch Pathol Lab Med. 2015;139:848–57.
6. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. Lancet. 2011;378:607–20.
7. Hruban RH, Klimstra DS. Adenocarcinoma of the pancreas. Semin Diagn Pathol. 2014;31:443–51.
8. Yeo TP, Lowenfels AB. Demographics and epidemiology of pancreatic cancer. Cancer J. 2012;18:477–84.
9. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. CA Cancer J Clin. 2015;65:5–29.
10. Amundadottir LT. Pancreatic Cancer Genetics. Int J Biol Sci. 2016;12:314–25.
11. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. Cancer Res. 2014;74:2913–21.
12. Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2009;6:699–708.
13. Bosetti C, Lucenteforte E, Silverman DT, Petersen G, Bracci PM, Ji BT, et al. Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). Ann Oncol. 2012;23:1880–8.

14. Lynch SM, Vrieling A, Lubin JH, Kraft P, Mendelsohn JB, Hartge P, et al. Cigarette smoking and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium. *Am J Epidemiol.* 2009;170:403–13.
15. Iodice S, Gandini S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbecks Arch Surg.* 2008;393:535–45.
16. Arslan AA, Helzlsouer KJ, Kooperberg C, Shu X-O, Steplowski E, Bueno-de-Mesquita HB, et al. Anthropometric measures, body mass index, and pancreatic cancer: a pooled analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan). *Arch Intern Med.* 2010;170:791–802.
17. Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de Gonzalez A, Barzi F, Woodward M. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer.* 2005;92:2076–83.
18. Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, Hruban RH. Recent progress in pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin.* 2013;63:318–48.
19. Pelzer U, Klein F, Bahra M, Sinn M, Dorken B, Neuhaus P, et al. Blood group determinates incidence for pancreatic cancer in Germany. *Front Physiol.* 2013;4:118.
20. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, et al. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med.* 1993;328:1433–7.
21. McWilliams RR, Rabe KG, Olswold C, Andrade M de, Petersen GM. Risk of malignancy in first-degree relatives of patients with pancreatic carcinoma. *Cancer.* 2005;104:388–94.
22. Shi C, Hruban RH, Klein AP. Familial pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133:365–74.
23. Seufferlein T, Adler G. The S3 guideline exocrine pancreatic cancer. *Med Klin (Munich).* 2009;104:869–74.
24. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2007;297:267–77.
25. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, et al. Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine

- following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2010;304:1073–81.
26. Onkologie H.: S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom.
27. Liao W-C, Chien K-L, Lin Y-L, Wu M-S, Lin J-T, Wang H-P, Tu Y-K. Adjuvant treatments for resected pancreatic adenocarcinoma: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2013;14:1095–103.
28. Haeno H, Gonen M, Davis MB, Herman JM, Iacobuzio-Donahue CA, Michor F. Computational modeling of pancreatic cancer reveals kinetics of metastasis suggesting optimum treatment strategies. *Cell*. 2012;148:362–75.
29. Sharma G, Whang EE, Ruan DT, Ito H. Efficacy of Neoadjuvant Versus Adjuvant Therapy for Resectable Pancreatic Adenocarcinoma: A Decision Analysis. *Ann Surg Oncol*. 2015;22 Suppl 3:37.
30. McClaine RJ, Lowy AM, Sussman JJ, Schmulewitz N, Grisell DL, Ahmad SA. Neoadjuvant therapy may lead to successful surgical resection and improved survival in patients with borderline resectable pancreatic cancer. *HPB (Oxford)*. 2010;12:73–9.
31. Laurence JM, Tran PD, Morarji K, Eslick GD, Lam VWT, Sandroussi C. A systematic review and meta-analysis of survival and surgical outcomes following neoadjuvant chemoradiotherapy for pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg*. 2011;15:2059–69.
32. Chun YS, Cooper HS, Cohen SJ, Konski A, Burtneß B, Denlinger CS, et al. Significance of pathologic response to preoperative therapy in pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol*. 2011;18:3601–7.
33. Andriulli A, Festa V, Botteri E, Valvano MR, Koch M, Bassi C, et al. Neoadjuvant/preoperative gemcitabine for patients with localized pancreatic cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Ann Surg Oncol*. 2012;19:1644–62.
34. Sultana A, Smith CT, Cunningham D, Starling N, Neoptolemos JP, Ghaneh P. Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25:2607–15.
35. Burris HA3, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol*. 1997;15:2403–13.

36. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol*. 2007;25:1960–6.
37. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Guimbaud R, Becouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 2011;364:1817–25.
38. Suker M, Beumer BR, Sadot E, Marthey L, Faris JE, Mellon EA, et al. FOLFIRINOX for locally advanced pancreatic cancer: a systematic review and patient-level meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2016;17:801–10.
39. Hoff DD von, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med*. 2013;369:1691–703.
40. Wong A, Soo RA, Yong W-P, Innocenti F. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of gemcitabine. *Drug Metab Rev*. 2009;41:77–88.
41. Mackey JR, Mani RS, Selner M, Mowles D, Young JD, Belt JA, et al. Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res*. 1998;58:4349–57.
42. Garcia-Manteiga J, Molina-Arcas M, Casado FJ, Mazo A, Pastor-Anglada M. Nucleoside transporter profiles in human pancreatic cancer cells: role of hCNT1 in 2',2'-difluorodeoxycytidine- induced cytotoxicity. *Clin Cancer Res*. 2003;9:5000–8.
43. Ritzel MW, Ng AM, Yao SY, Graham K, Loewen SK, Smith KM, et al. Recent molecular advances in studies of the concentrative Na⁺-dependent nucleoside transporter (CNT) family: identification and characterization of novel human and mouse proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *Mol Membr Biol*. 2001;18:65–72.
44. Huang P, Plunkett W. Induction of apoptosis by gemcitabine. *Semin Oncol*. 1995;22:19–25.
45. Plunkett W, Huang P, Xu YZ, Heinemann V, Grunewald R, Gandhi V. Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential. *Semin Oncol*. 1995;22:3–10.

46. Smid K, van Moorsel CJ, Noordhuis P, Voorn DA, Peters GJ. Interference of gemcitabine triphosphate with the measurements of deoxynucleotides using an optimized DNA polymerase elongation assay. *Int J Oncol.* 2001;19:157–62.
47. Heinemann V, Schulz L, Issels RD, Plunkett W. Gemcitabine: a modulator of intracellular nucleotide and deoxynucleotide metabolism. *Semin Oncol.* 1995;22:11–8.
48. Heinemann V, Xu YZ, Chubb S, Sen A, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. Cellular elimination of 2',2'-difluorodeoxycytidine 5'-triphosphate: a mechanism of self-potential. *Cancer Res.* 1992;52:533–9.
49. Pourquier P, Gioffre C, Kohlhagen G, Urasaki Y, Goldwasser F, Hertel LW, et al. Gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine), an antimetabolite that poisons topoisomerase I. *Clin Cancer Res.* 2002;8:2499–504.
50. Neye H. Therapeutic renaissance. Biguanides in type-2 diabetes: metformin. *Pharm Unserer Zeit.* 2002;31:264–70.
51. Bosi E. Metformin--the gold standard in type 2 diabetes: what does the evidence tell us? *Diabetes Obes Metab.* 2009;11 Suppl 2:3–8.
52. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J.* 2000;348 Pt 3:607–14.
53. El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Averet N, Rigoulet M, Leverve X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem.* 2000;275:223–8.
54. Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res.* 2007;100:328–41.
55. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 2001;108:1167–74.
56. Xie Z, Dong Y, Scholz R, Neumann D, Zou M-H. Phosphorylation of LKB1 at serine 428 by protein kinase C-zeta is required for metformin-enhanced activation of the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circulation.* 2008;117:952–62.
57. Oakhill JS, Steel R, Chen Z-P, Scott JW, Ling N, Tam S, Kemp BE. AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science.* 2011;332:1433–5.

58. Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Makela TP, et al. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol.* 2003;2:28.
59. Evans JMM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ.* 2005;330:1304–5.
60. Kisfalvi K, Eibl G, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. Metformin disrupts crosstalk between G protein-coupled receptor and insulin receptor signaling systems and inhibits pancreatic cancer growth. *Cancer Res.* 2009;69:6539–45.
61. Wang L-W, Li Z-S, Zou D-W, Jin Z-D, Gao J, Xu G-M. Metformin induces apoptosis of pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol.* 2008;14:7192–8.
62. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Del Barco S, Martin-Castillo B, Menendez JA. If mammalian target of metformin indirectly is mammalian target of rapamycin, then the insulin-like growth factor-1 receptor axis will audit the efficacy of metformin in cancer clinical trials. *J Clin Oncol.* 2009;27:207–9.
63. Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Yang X, Lind SE, Thor AD. Potent anti-proliferative effects of metformin on trastuzumab-resistant breast cancer cells via inhibition of erbB2/IGF-1 receptor interactions. *Cell Cycle.* 2011;10:2959–66.
64. Akinyeke T, Matsumura S, Wang X, Wu Y, Schalfer ED, Saxena A, et al. Metformin targets c-MYC oncogene to prevent prostate cancer. *Carcinogenesis.* 2013;34:2823–32.
65. Deng X-S, Wang S, Deng A, Liu B, Edgerton SM, Lind SE, et al. Metformin targets Stat3 to inhibit cell growth and induce apoptosis in triple-negative breast cancers. *Cell Cycle.* 2012;11:367–76.
66. Martin-Castillo B, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Menendez JA. Metformin and cancer: doses, mechanisms and the dandelion and hormetic phenomena. *Cell Cycle.* 2010;9:1057–64.
67. Zannella VE, Dal Pra A, Muaddi H, McKee TD, Stapleton S, Sykes J, et al. Reprogramming metabolism with metformin improves tumor oxygenation and radiotherapy response. *Clin Cancer Res.* 2013;19:6741–50.
68. Fidler IJ, Hart IR. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science.* 1982;217:998–1003.
69. Apostoli AJ, Ailles L. Clonal evolution and tumor-initiating cells: New dimensions in cancer patient treatment. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2016;53:40–51.

70. Heppner GH. Tumor heterogeneity. *Cancer Res.* 1984;44:2259–65.
71. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976;194:23–8.
72. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57–70.
73. Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* 1991;51:3075–9.
74. Saunders NA, Simpson F, Thompson EW, Hill MM, Endo-Munoz L, Leggatt G, et al. Role of intratumoural heterogeneity in cancer drug resistance: molecular and clinical perspectives. *EMBO Mol Med.* 2012;4:675–84.
75. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012;366:883–92.
76. Bailey JM, Alsina J, Rasheed ZA, McAllister FM, Fu Y-Y, Plentz R, et al. DCLK1 marks a morphologically distinct subpopulation of cells with stem cell properties in preinvasive pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 2014;146:245–56.
77. Bao B, Ahmad A, Azmi AS, Ali S, Sarkar FH. Overview of cancer stem cells (CSCs) and mechanisms of their regulation: implications for cancer therapy. *Curr Protoc Pharmacol.* 2013;Chapter 14:14.
78. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer.* 2008;8:755–68.
79. Sancho P, Alcala S, Usachov V, Hermann PC, Sainz B, JR. The ever-changing landscape of pancreatic cancer stem cells. *Pancreatology.* 2016;16:489–96.
80. Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature.* 2013;501:328–37.
81. Weber CE, Kuo PC. The tumor microenvironment. *Surg Oncol.* 2012;21:172–7.
82. Witz IP, Levy-Nissenbaum O. The tumor microenvironment in the post-PAGET era. *Cancer Lett.* 2006;242:1–10.
83. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature.* 2001;411:375–9.
84. Horsman MR, Vaupel P. Pathophysiological Basis for the Formation of the Tumor Microenvironment. *Front Oncol.* 2016;6:66.
85. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.* 1989;49:6449–65.

86. Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett.* 2007;581:3582–91.
87. Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. HIF at a glance. *J Cell Sci.* 2009;122:1055–7.
88. Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett.* 2007;581:3582–91.
89. Bindra RS, Glazer PM. Genetic instability and the tumor microenvironment: towards the concept of microenvironment-induced mutagenesis. *Mutat Res.* 2005;569:75–85.
90. Chu GC, Kimmelman AC, Hezel AF, DePinho RA. Stromal biology of pancreatic cancer. *J Cell Biochem.* 2007;101:887–907.
91. Bailey JM, Swanson BJ, Hamada T, Eggers JP, Singh PK, Caffery T, et al. Sonic hedgehog promotes desmoplasia in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14:5995–6004.
92. Apte MV, Wilson JS. Dangerous liaisons: pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012;27 Suppl 2:69–74.
93. Apte MV, Park S, Phillips PA, Santucci N, Goldstein D, Kumar RK, et al. Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas.* 2004;29:179–87.
94. Hwang RF, Moore T, Arumugam T, Ramachandran V, Amos KD, Rivera A, et al. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res.* 2008;68:918–26.
95. Vaquero EC, Edderkaoui M, Nam KJ, Gukovsky I, Pandol SJ, Gukovskaya AS. Extracellular matrix proteins protect pancreatic cancer cells from death via mitochondrial and nonmitochondrial pathways. *Gastroenterology.* 2003;125:1188–202.
96. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science.* 2009;324:1457–61.
97. Provenzano PP, Cuevas C, Chang AE, Goel VK, Hoff DD von, Hingorani SR. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell.* 2012;21:418–29.
98. Jacobetz MA, Chan DS, Neesse A, Bapiro TE, Cook N, Frese KK, et al. Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut.* 2013;62:112–20.

99. Nielsen MFB, Mortensen MB, Detlefsen S. Key players in pancreatic cancer-stroma interaction: Cancer-associated fibroblasts, endothelial and inflammatory cells. *World J Gastroenterol.* 2016;22:2678–700.
100. Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science.* 1988;240:177–84.
101. Yokoi K, Fidler IJ. Hypoxia increases resistance of human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by gemcitabine. *Clin Cancer Res.* 2004;10:2299–306.
102. Raghunand N, Gillies RJ. pH and drug resistance in tumors. *Drug Resist Updat.* 2000;3:39–47.
103. Onozuka H, Tsuchihara K, Esumi H. Hypoglycemic/hypoxic condition in vitro mimicking the tumor microenvironment markedly reduced the efficacy of anticancer drugs. *Cancer Sci.* 2011;102:975–82.
104. Hockel M, Schlenger K, Hockel S, Vaupel P. Hypoxic cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive. *Cancer Res.* 1999;59:4525–8.
105. Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, et al. The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene.* 2003;22:3213–20.
106. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:781–810.
107. Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, et al. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol.* 2002;22:1184–93.
108. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis.* 2008;4:68–75.
109. Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, et al. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature.* 1996;382:225–30.
110. Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, et al. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature.* 2000;407:530–5.
111. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.* 2009;17:9–26.
112. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* 1998;281:1509–12.

113. Pelengaris S, Khan M, Evan G. c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:764–76.
114. Al-Aynati MM, Radulovich N, Riddell RH, Tsao M-S. Epithelial-cadherin and beta-catenin expression changes in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Clin Cancer Res*. 2004;10:1235–40.
115. White BD, Chien AJ, Dawson DW. Dysregulation of Wnt/beta-catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology*. 2012;142:219–32.
116. Zeng G, Germinaro M, Micsenyi A, Monga NK, Bell A, Sood A, et al. Aberrant Wnt/beta-catenin signaling in pancreatic adenocarcinoma. *Neoplasia*. 2006;8:279–89.
117. Jiang H, Li Q, He C, Li F, Sheng H, Shen X, et al. Activation of the Wnt pathway through Wnt2 promotes metastasis in pancreatic cancer. *Am J Cancer Res*. 2014;4:537–44.
118. Fu L, Zhang C, Zhang L-Y, Dong S-S, Lu L-H, Chen J, et al. Wnt2 secreted by tumour fibroblasts promotes tumour progression in oesophageal cancer by activation of the Wnt/beta-catenin signalling pathway. *Gut*. 2011;60:1635–43.
119. Avgustinova A, Iravani M, Robertson D, Fearn A, Gao Q, Klingbeil P, et al. Tumour cell-derived Wnt7a recruits and activates fibroblasts to promote tumour aggressiveness. *Nat Commun*. 2016;7:10305.
120. Macheda ML, Stacker SA. Importance of Wnt signaling in the tumor stroma microenvironment. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008;8:454–65.
121. Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*. 2003;4:437–50.
122. Burtin F. Einfluss von Metformin und Gemcitabin auf die Pathophysiologie des duktaalen Adenokarzinoms des Pankreas [Ina. zur Erlangung des Akad. Grades Dr. der Medizin]: Medizinischen Fak. der Univ. Rostock; 2015.
123. Radecke T. Einfluss von Inflammation und Diabetes auf die Pathophysiologie des duktaalen Adenokarzinoms des Pankreas [Ina. zur Erlangung des Akad. Grades Dr. der Medizin]. Rostock: Medizinischen Fak. der Univ. Rostock; 2015.
124. Saluja AK, Dudeja V. Relevance of animal models of pancreatic cancer and pancreatitis to human disease. *Gastroenterology*. 2013;144:1194–8.

125. Gingell R, Wallcave L, Nagel D, Kupper R, Pour P. Metabolism of the pancreatic carcinogens N-nitroso-bis(2-oxopropyl)amine and N-nitroso-bis(2-hydroxypropyl)amine in the Syrian hamster. *J Natl Cancer Inst.* 1976;57:1175–8.
126. Pour PM, Runge RG, Birt D, Gingell R, Lawson T, Nagel D, et al. Current knowledge of pancreatic carcinogenesis in the hamster and its relevance to the human disease. *Cancer.* 1981;47:1573–89.
127. Lijinsky W, Saavedra JE, Knutsen GL, Kovatch RM. Comparison of the carcinogenic effectiveness of N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine, N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine, N-nitroso(2-hydroxypropyl)(2-oxopropyl)amine, and N-nitroso-2,6-dimethylmorpholine in Syrian hamsters. *J Natl Cancer Inst.* 1984;72:685–8.
128. Konishi Y, Tsutsumi M, Tsujiuchi T. Mechanistic analysis of pancreatic ductal carcinogenesis in hamsters. *Pancreas.* 1998;16:300–6.
129. Qiu W, Su GH. Challenges and advances in mouse modeling for human pancreatic tumorigenesis and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2013;32:83–107.
130. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Anver MR, Biankin AV, Boivin GP, et al. Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations. *Cancer Res.* 2006;66:95–106.
131. Becher OJ, Holland EC. Genetically engineered models have advantages over xenografts for preclinical studies. *Cancer Res.* 2006;66:3355–8, discussion 3358–9.
132. Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer.* 1975;15:741–7.
133. Yunis AA, Arimura GK, Russin DJ. Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *Int J Cancer.* 1977;19:128–35.
134. Bosma MJ, Carroll AM. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:323–50.
135. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood.* 2002;100:3175–82.

136. Zhang Y, Chen L, Yang J, Fleming JB, Chiao PJ, Logsdon CD, Li M. Study human pancreatic cancer in mice: How close are they? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2013;1835:110–8.
137. Talmadge JE. Immune cell infiltration of primary and metastatic lesions: mechanisms and clinical impact. *Semin Cancer Biol*. 2011;21:131–8.
138. Partecke LI, Sandler M, Kaeding A, Weiss FU, Mayerle J, Dummer A, et al. A syngeneic orthotopic murine model of pancreatic adenocarcinoma in the C57/BL6 mouse using the Panc02 and 6606PDA cell lines. *Eur Surg Res*. 2011;47:98–107.
139. Bibby MC. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *Eur J Cancer*. 2004;40:852–7.
140. Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *Am J Pathol*. 2007;170:793–804.
141. Reyes G, Villanueva A, Garcia C, Sancho FJ, Piulats J, Lluís F, Capella G. Orthotopic xenografts of human pancreatic carcinomas acquire genetic aberrations during dissemination in nude mice. *Cancer Res*. 1996;56:5713–9.
142. Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev*. 1998-1999;17:279–84.
143. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646–74.
144. Bai X, Zhang Q, Wu S, Zhang X, Wang M, He F, et al. Characteristics of Tumor Infiltrating Lymphocyte and Circulating Lymphocyte Repertoires in Pancreatic Cancer by the Sequencing of T Cell Receptors. *Sci. Rep*. 2015;5:13664.
145. Gattinoni L, Ji Y, Restifo NP. Wnt/ -Catenin Signaling in T-Cell Immunity and Cancer Immunotherapy. *Clinical Cancer Research*. 2010;16:4695–701.
146. Boudousquié C, Danilo M, Pousse L, Jeevan-Raj B, Angelov GS, Chennupati V, et al. Differences in the Transduction of Canonical Wnt Signals Demarcate Effector and Memory CD8 T Cells with Distinct Recall Proliferation Capacity. *J.I.* 2014;193:2784–91.
147. Avgustinova A, Iravani M, Robertson D, Fearn A, Gao Q, Klingbeil P, et al. Tumour cell-derived Wnt7a recruits and activates fibroblasts to promote tumour aggressiveness. *Nat Commun*. 2016;7:10305.

148. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10356–61.
149. Ripka S, Konig A, Buchholz M, Wagner M, Sipos B, Kloppel G, et al. WNT5A--target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer. *Carcinogenesis*. 2007;28:1178–87.
150. Nakajima M, Fukuchi M, Miyazaki T, Masuda N, Kato H, Kuwano H. Reduced expression of Axin correlates with tumour progression of oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2003;88:1734–9.
151. Xu H-T, Wang L, Lin D, Liu Y, Liu N, Yuan X-M, Wang E-H. Abnormal beta-catenin and reduced axin expression are associated with poor differentiation and progression in non-small cell lung cancer. *Am J Clin Pathol*. 2006;125:534–41.
152. Chen S-H, Li D-L, Yang F, Wu Z, Zhao Y-Y, Jiang Y. Gemcitabine-induced pancreatic cancer cell death is associated with MST1/cyclophilin D mitochondrial complexation. *Biochimie*. 2014;103:71–9.
153. Hessmann E, Patzak MS, Klein L, Chen N, Kari V, Ramu I, et al. Fibroblast drug scavenging increases intratumoural gemcitabine accumulation in murine pancreas cancer. *Gut* 2017.
154. Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev*. 2009;89:1025–78.
155. Yong-Xian G, Xiao-Huan L, Fan Z, Guo-Fang T. Gemcitabine inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer PANC-1 cells. *J Cancer Res Ther*. 2016;12:1–4.
156. Schniewind B, Christgen M, Kurdow R, Haye S, Kremer B, Kalthoff H, Ungefroren H. Resistance of pancreatic cancer to gemcitabine treatment is dependent on mitochondria-mediated apoptosis. *Int J Cancer*. 2004;109:182–8.
157. Wang M, Lu X, Dong X, Hao F, Liu Z, Ni G, Chen D. pERK1/2 silencing sensitizes pancreatic cancer BXPC-3 cell to gemcitabine-induced apoptosis via regulating Bax and Bcl-2 expression. *World J Surg Oncol*. 2015;13:66.
158. Arlt A, Muerkoster SS, Schafer H. Targeting apoptosis pathways in pancreatic cancer. *Cancer Lett*. 2013;332:346–58.
159. Wang L-W, Li Z-S, Zou D-W, Jin Z-D, Gao J, Xu G-M. Metformin induces apoptosis of pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol*. 2008;14:7192–8.

160. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.* 1999;59:5002–11.
161. Orimo A, Weinberg RA. Stromal Fibroblasts in Cancer: A Novel Tumor-Promoting Cell Type. *Cell Cycle.* 2014;5:1597–601.
162. Zechner D, Burtin F, Albert A-C, Zhang X, Kumstel S, Schonrogge M, et al. Intratumoral heterogeneity of the therapeutical response to gemcitabine and metformin. *Oncotarget.* 2016;7:56395–407.
163. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo S-H, Bardeesy N, DePinho RA, et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science.* 2005;310:1642–6.
164. Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Sonenberg N, Pollak M. Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res.* 2006;66:10269–73.
165. Tan X-L, Bhattacharyya KK, Dutta SK, Bamlet WR, Rabe KG, Wang E, et al. Metformin suppresses pancreatic tumor growth with inhibition of NFkappaB/STAT3 inflammatory signaling. *Pancreas.* 2015;44:636–47.
166. Han J, Zhang L, Guo H, Wysham WZ, Roque DR, Willson AK, et al. Glucose promotes cell proliferation, glucose uptake and invasion in endometrial cancer cells via AMPK/mTOR/S6 and MAPK signaling. *Gynecol Oncol.* 2015;138:668–75.
167. Han L, Ma Q, Li J, Liu H, Li W, Ma G, et al. High glucose promotes pancreatic cancer cell proliferation via the induction of EGF expression and transactivation of EGFR. *PLoS One.* 2011;6:e27074.
168. Li J, Ma J, Han L, Xu Q, Lei J, Duan W, et al. Hyperglycemic tumor microenvironment induces perineural invasion in pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther.* 2015;16:912–21.
169. Zhuang Y, Chan DK, Haugrud AB, Miskimins WK. Mechanisms by which low glucose enhances the cytotoxicity of metformin to cancer cells both in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2014;9:e108444.
170. Sinnott-Smith J, Kisfalvi K, Kui R, Rozengurt E. Metformin inhibition of mTORC1 activation, DNA synthesis and proliferation in pancreatic cancer cells: dependence on glucose concentration and role of AMPK. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;430:352–7.

171. Koong AC, Mehta VK, Le QT, Fisher GA, Terris DJ, Brown JM, et al. Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000;48:919–22.
172. Graham CH, Forsdike J, Fitzgerald CJ, Macdonald-Goodfellow S. Hypoxia-mediated stimulation of carcinoma cell invasiveness via upregulation of urokinase receptor expression. *Int J Cancer*. 1999;80:617–23.
173. Chen EY, Mazure NM, Cooper JA, Giaccia AJ. Hypoxia activates a platelet-derived growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway that results in glycogen synthase kinase-3 inactivation. *Cancer Res*. 2001;61:2429–33.
174. WARBURG O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123:309–14.
175. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*. 2004;4:891–9.
176. Zhang X, Lin Y, Gillies RJ. Tumor pH and its measurement. *J Nucl Med*. 2010;51:1167–70.
177. Wu H, Ying M, Hu X. Lactic acidosis switches cancer cells from aerobic glycolysis back to dominant oxidative phosphorylation. *Oncotarget*. 2014;40621–9.
178. Bhowmick NA, Moses HL. Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15:97–101.
179. Verbeke C. Morphological heterogeneity in ductal adenocarcinoma of the pancreas - Does it matter? *Pancreatology*. 2016:295–301.
180. Brancato V, Comunanza V, Imparato G, Cora D, Urciuolo F, Noghero A, et al. Bioengineered tumoral microtissues recapitulate desmoplastic reaction of pancreatic cancer. *Acta Biomater*. 2017;49:152–66.

Danksagung

Einen besonderen Dank möchte ich Frau Professor Brigitte Vollmar, der Direktorin des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock, für die Möglichkeit, die Promotionsarbeit an ihrem Institut durchführen zu können, aussprechen.

Ich danke auch meinem Betreuer Herrn PD Dr. rer. nat. Dietmar Zechner, der mir mit seinem unermüdlichen Engagement stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Für seine Ehrlichkeit und die Kollegialität bin ich sehr dankbar.

Des Weiteren möchte ich allen Mitarbeitern des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie für ihre Motivation und die freundliche Unterstützung in den letzten Jahren danken. Besonders danke ich Berit Blendow, Dorothea Frenz und Maren Nerowski für ihre Hilfe in der Zellkultur, der Histologie, Molekularbiologie und bei der Durchführung der tierexperimentellen Versuche. Florian Bürtin danke ich für die Bereitstellung der Tumore in Abbildung 3, 4, 5, 6 sowie Ergänzung der Daten in Abbildung 9. Tobias Radecke danke ich für die Bereitstellung der Tumore in Abbildung 6.

Tief verbunden und dankbar bin ich Simon Ohm für seine unglaublich hilfreiche Unterstützung und sein Verständnis bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit. Nicht zuletzt möchte ich einen sehr herzlichen Dank meinen Eltern, Großeltern und meiner Schwester aussprechen, die mir mein Studium durch ihre Unterstützung ermöglicht haben.

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten:

Zechner D, Albert A, Bürtin F, Vollmar B. Metformin Inhibits Gemcitabine Induced Apoptosis In Pancreatic Cancer Cell Lines. J Cancer. 2017; 1;8(10):1744-1749.

Zechner D, Kroemer T, Albert A, Schönrogge M, Radecke T, Vollmar B. Analysis of Axin2 expression and function in murine models for pancreatic cancer. Cell & Bioscience. 2016; 6(1):49.

Zechner D, Bürtin F, Albert A, Zhang X, Kumstel S, Schönrogge M, Graffunder J, Shih H, Müller S, Radecke T, Jaster R, Vollmar B. Intratumoral heterogeneity of the therapeutical response to gemcitabine and metformin. Oncotarget. 2016; 30:7(35):56395-56407.

Zechner D, Radecke T, Amme J, Bürtin F, Albert A, Partecke LI, Vollmar B. Impact of diabetes type II and chronic inflammation on pancreatic cancer growth and the cancer stem cell compartment. BMC Cancer. 2015; 15:51.

Kongressbeiträge:

Zechner D, Radecke T, Amme J, Bürtin F, Albert A, Partecke LI, Vollmar B: Differential impact of diabetes type II and chronic inflammation on pancreatic cancer. 47th Annual meeting of the European Pancreatic Club 24-26.06.2015, Toledo, Spanien.

Thesen der Dissertation

- Das duktale Adenokarzinom des Pankreas besitzt trotz intensiver Erforschung und der Einführung moderner Therapiekonzepte und Chemotherapeutika eine sehr schlechte Prognose.
- Sowohl im kurativen als auch im palliativen Setting spielt die Chemotherapie eine zentrale Rolle.
- Das derzeit verwendete Standardtherapeutikum Gemcitabin verlängert das Gesamtüberleben nur um einige Monate.
- Das duktale Adenokarzinom des Pankreas weist eine intratumorale Heterogenität auf, die unter anderem durch Hypoxie, Azidität, Glukosedepprivation und das Vorhandensein unterschiedlicher Zellpopulationen charakterisiert ist.
- Die intratumorale Heterogenität des Adenokarzinoms beeinflusst die Wirksamkeit von Gemcitabin und Metformin in Bezug auf die Karzinomzellproliferation.
- Während Gemcitabin einen erhöhten antiproliferativen Effekt im Tumorrinneren vermittelt, hemmt Metformin die Karzinomzellproliferation stärker am Tumorrandbereich.
- Die in vivo beobachtete Wirksamkeit von Gemcitabin und Metformin kann in vitro nur in wenigen Teilaspekten reproduziert werden.
- Gemcitabin und Metformin stellen eine sinnvolle Kombinationstherapie des duktales pankreatischen Adenokarzinoms dar, weil sie die Karzinomzellproliferation in unterschiedlichen Arealen des Tumors hemmen.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt habe. Die aus anderer Literatur verwendeten Inhalte sind als solche kenntlich gemacht. Ich bestätige, dass diese Arbeit an keiner anderen als der Universität Rostock zur Erlangung des Grades Doktor der Medizin vorgelegt wurde.

Rostock, im Juni 2017

Ann-Christin Albert